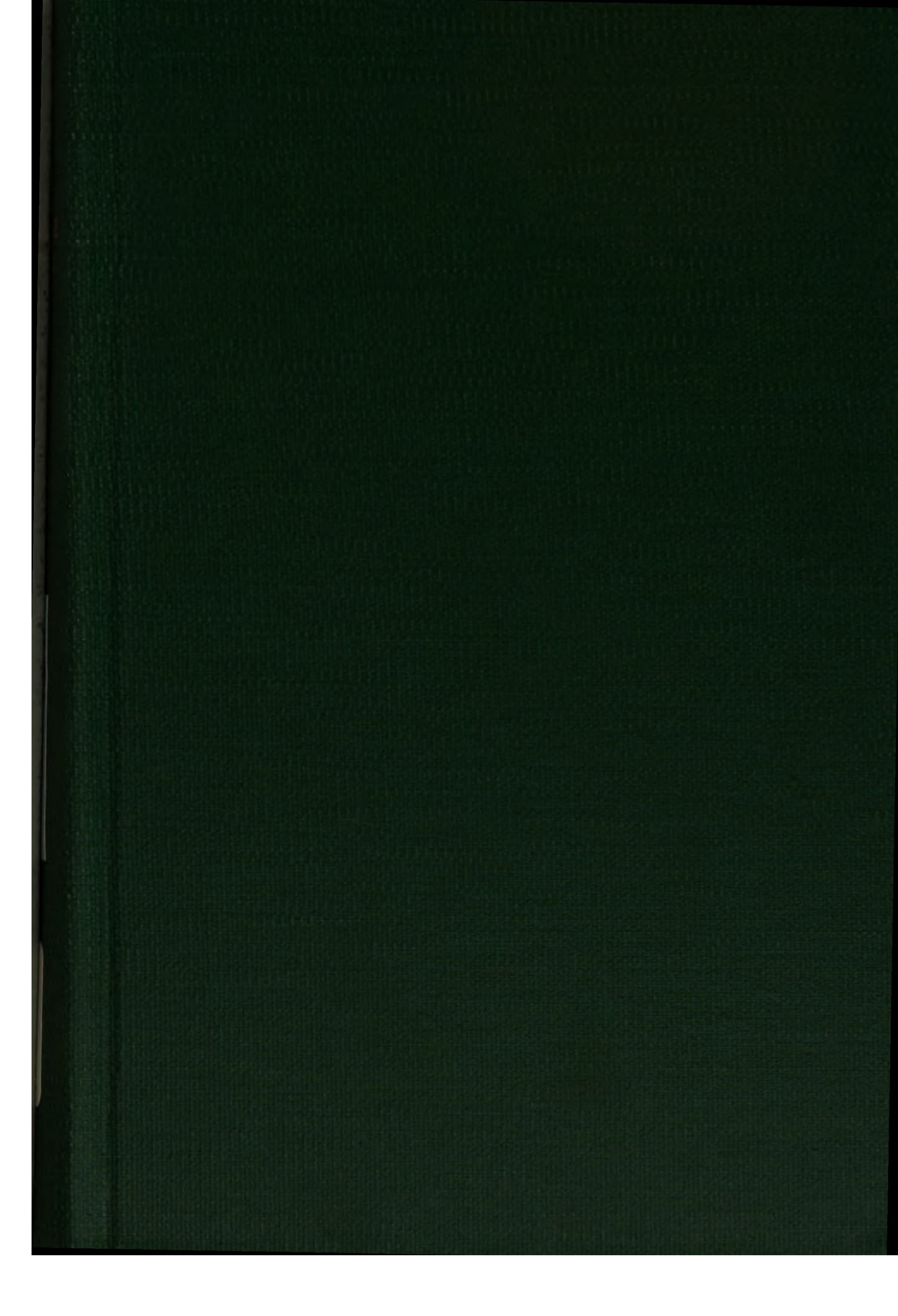




Biochemische Zeitschrift

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

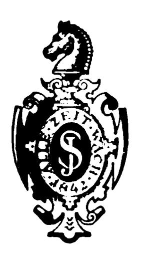
F. Hofmeister-Würzburg, **C. von Noorden**-Frankfurt a. M., **E. Salkowski**-Berlin, **A. von Wassermann**-Berlin

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hundertdreißigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1922

Inhaltsverzeichnis.

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig

Biochemische Zeitschrift

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Würzburg, C. von Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, A. von Wassermann-Berlin,

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hundertdreißigster Band

Erstes bis drittes Heft

Ausgegeben am 20. Juni 1922



Berlin

Verlag von Julius Springer

1922

Die **Biochemische Zeitschrift**

erscheint in zwanglosen Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis eines jeden Bandes im Umfange von 40 Bogen beträgt M. 360.— Die Biochemische Zeitschrift ist durch jede Buchhandlung sowie durch die unterzeichnete Verlagsbuchhandlung zu beziehen.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als $1^1/_2$ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens 2 Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Redakteur,

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,

zu richten.

Die Verfasser erhalten 100 Sonderabdrücke ihrer Abhandlungen kostenfrei bis zu einem Umfang von $1^1/_2$ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur 75, weitere gegen Berechnung.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer

Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

130. Band. **Inhaltsverzeichnis.** Heft 1/3.

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe III. Umschlagseite!

Über die fördernde Wirkung von Kohlensuspensionen und anderen Körpern mit großer Oberflächenentwicklung, wie Kolloidkieselsäure, Ferrum phosphoricum, Agar-Agar auf die Bildung von Gärungsgasen durch Bacterium coli in eiweißfreien Nährlösungen.

Von

Richard Labes.

(Eingegangen am 24. Februar 1922.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Auf Anregung von Herrn Geheimrat *Hahn*, Direktor des Freiburger Hygienischen Instituts, bemühte ich mich, eine eiweißfreie Nährlösung zu finden, welche die Gärtätigkeit der Kolibakterien begünstigt; dabei hatte ich anfangs scheinbar sehr guten Erfolg mit einer Lösung, die folgende Verbindungen enthielt:

Traubenzucker (variiert von 3—0,3%);
Magnesiumsulfat 0,01%;
Natriumchlorid 0,18% (zum großen Teil auch durch Kaliumchlorid zu ersetzen);
Kaliumchlorid 0,075%;
milchsaures Ammoniak (variiert von 0,63—0,063%) (statt des milchsauren Ammoniaks konnten mit gleichem Erfolge andere Stickstoffquellen, Ammoniumchlorid, Asparagin, bernsteinsaures Ammoniak, selbst Harnstoff, verwendet werden; ohne Stickstoffquelle dagegen trat keine Gärung auf; vgl. *Kuhtz*, Arch. f. Hyg. *58*. 1906);
Calciumchlorid 0,01%.

Ferner zur Variation und Regulation der $[H^{\cdot}]$ von 0 : 3,0 bis zu 2,5 : 0,5 wechselndes Verhältnis der Konzentrationen von primärem und sekundärem Natriumphosphat, wobei der Gesamtgehalt des Phosphates bis zu $^1/_{16}$ molar steigen konnte[1]).

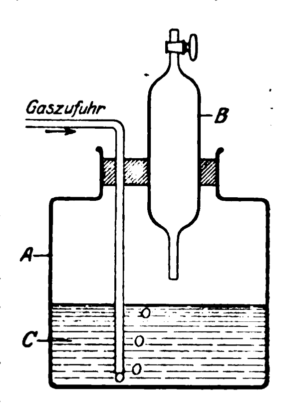
[1]) Auch durch Natriumcarbonat hätte man die zu starke Erhöhung des Säuregrades durch die sauren Produkte der Koligärung aufhalten können, aber durch die Säurebildung des Bact. coli wäre aus den Carbonaten gasförmige Kohlensäure freigeworden und man hätte keinen Anhaltspunkt gehabt, wieweit die gebildeten Gase von der aus den Carbonaten entbundenen Kohlensäure stammten oder aus dem vergorenen Traubenzucker.

Bei den nach obigen Methoden variierten Versuchsreihen variierte die nach 30 Stunden im kleinen Gärungssacharimeter (Höhe des geschlossenen Gärschenkels 11 cm) gebildete Gärgassäule zwischen 3—6 cm Höhe. Später gelang es außer mit sehr alten Kulturen mit keinem Kolistamm, diese Versuche zu wiederholen, ob die von 24stündigen Schrägagarkulturen abgeschwemmten Bakterien nun durch mehrfaches Zentrifugieren mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen wurden oder nicht. (Bei der Überimpfung wurden die Bakterien von nun ab mit der Öse entnommen. Es kam etwa $^1/_2$ Öse Bakterienkultur auf 100 ccm Nährlösung, und zwar natürlich zu jedem Versuch einer Reihe genau gleiche Mengen Bakterienaufschwemmung.) Vermutlich wurden mit dem bei der ersten Versuchsreihe zufällig reichlich vorhandenen Kondenswasser der Schrägagarröhrchen gärungsfördernde Stoffe mit übertragen. Doch gelang es nicht, etwa im Sinne der Biostheorie diese Stoffe durch Zusätze von geringen Mengen kolivergorener kurz sterilisierter Traubenzuckerbouillon oder von Apfelsinensaft, der durch Erhitzen auf 58° keimfrei gemacht war, zu ersetzen und die Gärung in Gang zu bringen. Dagegen hatte der Zusatz von geringen Mengen einer Aufkochung von Agar-Agar in destilliertem Wasser zu der Nährlösung vollen Erfolg. Der Agar-Agar hatte sich dabei in Form feiner Flocken in der Nährlösung verteilt. Daß organische Stoffe hierbei nicht maßgebend waren, ergab sich aus der weiteren Feststellung, daß ebenso wie der Agar-Agar auch Aufschwemmungen von Ferrum phosphoricum, Kieselsäure und Kohle zu der eiweißfreien Nährlösung zugesetzt, die Gärgasbildung gut in Gang brachten, und zwar sowohl bei ungewaschenen als auch bei gewaschenen Colibakterien. Beim Fortfall der Stickstoffquelle kam auch beim Agar-Agar keine Gärung zustande, was seine Bedeutung als Stickstoffquelle ausschließt. Um noch sicherer als durch die Waschungen die Übertragung irgendwelcher den Bakterien mitanhaftender Stoffe aus dem Schrägagar zu vermeiden, wurde in einer Reihe von Versuchen, wie bei *Braun* und *Kahn-Bronner* (Zentralbl. f. Bakteriol. 86, 196, 380. 1921) in der Weise vorgegangen, daß die Bakterien nicht direkt vom Schrägagar übernommen wurden, sondern viele Generationen hindurch die gleiche eiweißfreie, aber suspensionshaltige Versuchslösung passierten. Es schien hierbei sogar eine Steigerung der Gärfähigkeit einzutreten. Diese Versuche erinnern an die Mitteilungen von *Söhngen* (Fol. microbiol. 2, H. 1. 1913, und Zentralbl. f. Bakt. 2, 641. 1913), der bei anderen Mikroorganismen starke Förderung der Alkoholgärung durch Kohle und andere „Biokolloide“ feststellte.

Versuchstechnik und die wichtigsten Ergebnisse.

Die orientierenden Versuche wurden als Reihenversuche mit Abstufung der verschiedenen Konzentrationen der Bestandteile der Nähr-

lösung in kleinen Gärröhrchen nach Art der Gärungssacharimeter angesetzt. Die wichtigeren Versuchsresultate mit den besten Gärungserfolgen wurden in großen bauchpipettenartigen, 60 ccm fassenden, oben mit einem Hahn versehenen Gärröhren wiederholt. An der unteren Verjüngung derselben befanden sich einige Glasperlen, um zu verhindern, daß die sedimentierenden Teilchen der Aufschwemmung aus dem unteren Ende des Rohres entweichen konnten. Dieses Rohr wurde in eine Saftflasche gesenkt, die die gleiche Nährflüssigkeit enthielt, welche als Absperrflüssigkeit diente. In den Protokollen sind diese Gärrohre kurz als „Gasdurchlüftungsgärrohre" bezeichnet. Die in diesen Gasdurchlüftungsgärrohren gebildeten Gärgase wurden zur chemischen Gasanalyse entnommen. Ferner wurden die Sauerstoff- bzw. Gasdurchlüftungsversuche in diesen Rohren durchgeführt, um die Rolle, die der Sauerstoffgehalt der Nährlösung und der Suspension bei diesen Versuchen spielen konnte, zu untersuchen; und zwar geschah die Gasdurchlüftung in der zur Gärung bestimmten, bereits mit Kolibakterien beimpften und der Suspension versetzten Flüssigkeit in Gefäßen *A* (s. Zeichnung), die mit den eben beschriebenen Gärrohren *B* luftdicht verbunden waren. Das Gas, das die Nährflüssigkeit *C* passiert hatte, entwich durch das Gärrohr ins Freie. Nach genügender Durchlüftung der Gärlösung wurde das Gasrohr in die Nährflüssigkeit eingesenkt, diese in das Gärrohr hinübergetrieben und der Hahn desselben verschlossen. Wenn dann die Gärung einsetzte, entwich die durch die Gärgase aus dem Rohre verdrängte Flüssigkeit durch die untere Öffnung desselben in das Gasdurchlüftungsgefäß. Die Temperatur, bei der die Gärungsversuche vorgenommen wurden, betrug 35—38°.



Bei den Versuchen mit Kohle wurde mit etwa 1% Kohlegehalt gearbeitet. Verwendet wurde hierzu: 1. Kolloidale Kohle (das „Carcolid"); 2. kam zur Verwendung Blutkohle zum Teil ohne Vorbehandlung, zum Teil nach Extraktion mit Salzsäure. Der Kohlezusatz zeigte in allen Fällen gute Wirkung auf die Gärgasbildung. Dabei war es gleichgültig, ob ich sie zunächst durch Erhitzen im Trockenschrank sterilisierte und dann noch 24 Stunden in einer Petrischale in ganz flacher Schicht zur Luftadsorption stehenließ, bevor ich sie in der Nährlösung aufschwemmte, oder ob ich sie erst später in der Nährlösung im Dampftopf sterilisierte und dann nach Zusatz der Kolibakterien mit Wasserstoff oder Sauerstoff durchlüftete. Auch waren bei den Kohlesuspensionen Schwankungen im Salzgehalt der Nährlösungen lange nicht so ausschlaggebend wie

es dies bei den Kieselsäuresuspensionen in leider vorläufig noch nicht sehr durchsichtiger Weise der Fall ist. Bei den Kontrollen, bei denen in der Nährlösung entweder die Stickstoffquelle oder der Traubenzucker fehlte, war selbstverständlich mit der Kohle nie Gasbildung aufgetreten. Außer diesen beiden Kohlensorten wurde noch versucht mit einer aus Traubenzucker durch Übergießen mit konzentrierter Schwefelsäure hergestellten Kohle die Gärgasbildung zu steigern, jedoch mit einem kaum merkbaren Erfolge. Daß der auf diese Weise hergestellten Kohle schädliche Stoffe nicht anhafteten, konnte man daran erkennen, daß sie die durch andere Suspensionen bedingte Gärgasbildung durchaus nicht hemmte.

Weniger durchsichtig und nicht so konstant war die Wirkung der Kieselsäure auf die Gärgasbildung. Manchmal bewirkte sie in den eiweißfreien Nährlösungen eine der Traubenzuckerbouillongärung fast gleichwertige Gärgasbildung, sowohl was Schnelligkeit der Gasbildung als auch die Gesamtmenge des gebildeten Gases betrifft, während die nicht mit Kieselsäure versetzten Kulturen minimale oder gar keine Gärgasbildung zeigten. Bei anderen Versuchen, bei denen andere Kieselsäurepräparate verwendet wurden, die durch anderes Alter oder andere Vorbehandlung sich unterschieden, blieb die Gärgasbildung tagelang völlig aus, um dann evtl. plötzlich unter Begleitung von Kieselsäureausflockungen oder gallertigem Erstarren des Kieselsäuresols einzusetzen und außerordentlich schnell eine große Gasmenge nachzuliefern. In vereinzelten Fällen, in denen mit sehr frisch dargestellten Kieselsäurepräparaten gearbeitet wurde, blieb die Gasbildung völlig aus. Bei diesen Versuchen wurden drei verschiedene Ausgangsmaterialien benutzt. Zuerst wurde sterilisierter Liquor natrii silicici (spez. Gew. 1,3—1,4) verwendet, von dem 8,5 ccm bzw. 4,25 ccm in 50 ccm steriles destilliertes Wasser — manchmal wurde auch weniger Wasser verwendet — einpipettiert und mit etwa 28 ccm ebenfalls steriler normaler Salzsäure neutralisiert wurden. Die bei der Neutralisation entstehende Gallerte wurde dann durch sofortiges Schütteln zu einer sagoartigen Masse zerteilt und diese mit der gleichen Menge destillierten Wassers verdünnt, noch tage- bis wochenlang im sterilen Glaskolben unter wiederholtem Schütteln stehengelassen. Je länger dies stehenblieb, desto sicherer waren die Gärungsresultate. — Fügte man dann von dieser Aufschwemmung von Kieselsäuregelflocken 20 ccm auf 100 ccm Nährlösung zu, so senkte sich der größte Teil der Flocken ab. Ein anderer Teil war zunächst im Solzustand in der Nährlösung enthalten und fiel oft erst beim Einsetzen der Gärgasbildung in Form von wolkigen Massen zu Boden, an denen sich dann überall kleine Gasperlen befanden, die die Flocken oft von unten nach oben emportrugen. Mit dieser sehr alten, lange gestandenen Kieselsäureflockenaufschwemmung

(in den Protokollen als Kieselsäurepräparat I bezeichnet) wurden regelmäßig vorzügliche Gasbildungsresultate erzielt.

In einer anderen Reihe von Versuchen wurde ausgegangen von einem ebenfalls alten Gemisch, das 5% SiO_2 und vom Gesamt-SiO_2-Gehalt nur 12% als Natriumsilicat enthielt. Je weniger dieses Gemisch vor der Neutralisation mit Salzsäure verdünnt wurde, desto schneller fiel es aus, ging aber immer langsamer als das zuerst beschriebene Präparat und oft erst lange, nachdem es der Nährlösung zugesetzt war, völlig in den Gelzustand über, fiel in Form von Flocken, Wolken und Gerinnseln aus, und senkte sich zu Boden. Ebenso begünstigte es nicht so stark wie die Präparate von Liquor natrii silicici, die Gärung, war aber immerhin gut brauchbar. Es wirkte auch bei Hefe (sehr große Einsaat in Traubenzuckerbouillon stark fördernd auf die Gärgasbildung — bei Zimmertemperatur — ein. Demgegenüber war eine 0,6 proz. dialysierte Kieselsäure ganz minderwertig; sie fiel erst äußerst spät aus, und ebenso spät und unzuverlässig setzte die Gärgasbildung ein. Eine konzentrierte 1,7 proz. dialysierte Kieselsäure flockte in der Nährlösung besser aus, meist nach 1—2 Tagen, und gewöhnlich setzte dann gleichzeitig die Gasbildung ein. Dabei scheint die Ausflockbarkeit durch steigenden relativen Gehalt an primärem Natriumphosphat (wohl durch die Wasserstoffionen) sowie durch gesteigerten Kochsalzgehalt begünstigt und bis zu einem gewissen Grade parallel damit die Begünstigung der Gärgasbildung. Doch scheint manchmal bei stärker saurer Reaktion das Gärungsoptimum der Kochsalzkonzentration früher überschritten als bei alkalischer Reaktion.

Das Ferrum phosphoricum, das aus Eisenchloridlösung und Natriumphosphat dargestellt wurde, förderte die Gasbildung sehr. Da jedoch die Bedingung der Reproduzierbarkeit geeigneter Präparate nicht durchsichtig war, wurde später mit Ferrum phosphoricum albuminatum Merck gearbeitet.

Der Zusatz von Ferrum phosphoricum albuminatum zu der allein nicht zur Gärgasbildung geeigneten eiweißfreien Nährlösung hatte stets eine prompte und äußerst starke Gärgasbildung zur Folge; dabei kam der Stickstoffgehalt dieses Präparates nicht als Nährquelle in Frage; denn die Gärgasbildung blieb aus, wenn Lösungen ohne eigene Stickstoffquelle verwandt wurden. Dabei wurde das Ferrum phosphoricum in verschiedener Weise in den Versuchsreihen angewandt. Zunächst wurden etwa 50 mg des durch Hitze trocken sterilisierten Pulvers auf 10 ccm Nährlösung zugesetzt, das Ganze geschüttelt und dann der Gärung überlassen, ohne daß die nicht gelösten Teile des Ferrum phosphoricum abfiltriert wurden. (Im Protokoll als „Ferrum phosphoricum nicht abfiltriert“ bezeichnet.) In anderen Versuchen wurde die Nährlösung mit dem Ferrum phosphoricum geschüttelt, der nicht in kolloidale Lösung übergegangene Teil durch Filtrieren

Tabelle I.

Gärgasbildung von Bact. coli in Gärungssacharimetern (geschlossener Schenkel 11 cm hoch) in eiweißfreier Nährlösung mit und ohne Zusatz verschiedener in der Nährlösung aufgeschwemmter Substanzen, s. Anmerkung.

Versuchsnummer	Molare Konzentration der verschiedenen Bestandteile der Nährlösung: Traubenzucker	Ammoniumchlorid	Ammoniumlactat	sekundär. Natriumphosphat	primäres Natriumphosphat	Magnesiumsulfat	Kaliumchlorid	Natriumchlorid	Calciumchlorid	Art und Menge des Zusatzes berechnet auf 10 ccm Nährlösung	Höhe der Gassäule im geschlossenen Gärrohrschenkel
1	0,02	0,00	0,06	0,006	0,003	0,00038	0,011	0,017	0,0005	+ 0,8 ccm 1,5% Agaragaraufkochung	2,0 ccm n. 72 Stdn.
2	0,02	0,00	0,06	0,006	0,003	0,00038	0,011	0,017	0,0005	+ 0,0 ccm dgl.	0,0 „ „ 72 „
3	0,02	0,06	0,0	0,013	0,0033	0,00038	0,011	0,085	0,0005	+ 0,8 „ „	3,1 „ „ 96 „
4	0,02	0,06	0,0	0,013	0,0033	0,00038	0,011	0,085	0,0005	+ 0,0 „ „	0,0 „ „ 96 „
5	0,02	0,00	0,1	0,013	0,0033	0,00038	0,011	0,15	0,0005	+ 0,8 „ „	3,6 „ „ 96 „
6	0,02	0,00	0,0	0,013	0,0033	0,00038	0,011	0,15	0,0005	+ 0,8 „ „	0,0 „ „ 96 „
7	0,016	0,07	0,0	0,011	0,003	0,0003	0,084	0,12	0,00044	+ 1,5 ccm Kieselsäurepräparat I	3,7 „ „ 22 „
8	0,016	0,07	0,0	0,011	0,003	0,0003	0,084	0,12	0,00044	+ 0,0 ccm dgl.	0,5 „ „ 22 „
9	0,02	0,08	0,0	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	+ 40 mg Blutkohle	2,2 „ „ 30 „
10	0,02	0,08	0,0	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	+ 120 „ „	4,3 „ „ 30 „
11	0,02	0,08	0,0	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	+ 0,0 „ „	0,6 „ „ 30 „
12	0,02	0,08	0,0	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	+ 150 „ „	2,9 „ „ 24 „
13	0,02	0,08	0,0	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	+ 0,0 „ „	0,2 „ „ 24 „
14	0,02	0,0	0,0	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	+ 150 „ „	0,0 „ „ 24 „
15	0,02	0,08	0,0	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	Ferrum phosphoric.*)	3,2 „ „ 36 „
16	0,02	0,08	0,0	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	+ 0,0	0,0 „ „ 36 „
17	0,02	0,08	0,0	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	+ 40 mg Ferr. phosph. albumin. nicht abfiltriert	3,9 „ „ 30 „
18	0,02	0,08	0,0	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	+ 120 mg dgl.	4,6 „ „ 30 „
19	0,02	0,08	0,0	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	+ 0,0 „ „	0,6 „ „ 30 „
20	0,02	0,08	0,0	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	+ 80 „ „	3,2 „ „ 30 „
21	0,02	0,0	0,0	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	+ 80 „ „	0,0 „ „ 30 „

*) Hergestellt aus Eisenchlorid- und Natriumphosphatlösung (zu 10 ccm Nährlösung ist etwa 0,00033 g Molekül zugefügt).

Anmerkung. Die Versuche, die zwischen zwei horizontalen Trennungsstrichen stehen, gehören immer einer Versuchsreihe an, die gleichzeitig mit der gleichen Kolikultur beimpft wurde.

abgetrennt und die kolloidale Lösung des **Ferrum phosphoricum** bei **56° sterilisiert** (im Protokoll als „Ferrum phosphoricum albuminatum filtriert" bezeichnet). Diese Lösung hatte den außerordentlichen Vorzug, daß sich die Bakterienentwicklung durch Trübung stark bemerkbar machte, und es ließ sich in einigen Nebenversuchen auch feststellen, daß eine Reihe anderer Bakterien hierin sehr gut wachsen können (doch wurde bei diesen anderen Bakterienarten das Wachstum nicht durch viele Generationen hindurch geprüft). — Sobald das Bakterienwachstum sich stärker bemerkbar macht, fällt ein großer Teil des Ferrum phosphoricum als flockige, leicht klebrige, wachsartige, oft weiß, manchmal auch gelbgefärbte Masse zu Boden oder haftet sich an den Wandungen der Gefäße an. — Auch diese kolloidale Lösung von Ferrum phosphoricum albuminatum in der üblichen Nährmischung gibt der Traubenzuckerbouillon annähernd gleichwertige Resultate in bezug auf Gärgasbildung.

Tabelle II.

Gärung von Bact. coli commune in „Gasdurchlüftungsgärrohren" mit Analyse der gebildeten Gärgase.

Versuchsnummer	Molare Konzentration der verschiedenen Bestandteile der Nährlösung								Art und Menge des Zusatzes berechnet auf 100 ccm Nährlösung	Menge und Art der nach angegebener Zeit gebildeten Gärgase	
	Traubenzucker	Ammoniumchlorid	sekundär. Natriumphosphat	primäres Natriumphosphat	Magnesiumsulfat	Kaliumchlorid	Natriumchlorid	Calciumchlorid		Wasserstoff	Kohlendioxyd
										nach 64 Stunden	
1	0,023	0,1	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,3	0,0005	+ 0,00 g	0,0 ccm	0,0 ccm
2	0,023	0,1	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,3	0,0005	+ 1,0 „ Blutkohle	14,2 „	6,0 „
										nach 38 Stunden	
3	0,02	0,083	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	+ 0,00	0,0 ccm	0,0 ccm
4	0,02	0,083	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	+ Ferr. phosph. albumin. abfiltriert	15,1 „	5,2 „
										nach 80 Stunden	
5	0,02	0,059	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	+ 12,5 ccm Kieselsäurepräparat I*)	11,3 ccm	2,8 ccm

*) Da dieses Kieselsäurepräparat noch nicht genügend gealtert war und schlechte Resultate gab (s. auch Tabelle III), wurde zur Erhöhung seiner Wirksamkeit durch die mit demselben versetzte Nährlösung drei Stunden lang mit der Wasserstrahlluftpumpe sterile Luft durchgesaugt und danach die Beimpfung mit Bact. coli vorgenommen.

Die Deutung dieser Vorgänge erscheint schwer. Das wesentliche gemeinsame Merkmal all dieser Körper ist die große Oberflächenentwicklung, die durch Adsorptionswirkungen zu Konzentrationsdifferenzen verschiedener biologisch wirksamer Stoffe (Gase, Stoffwechselprodukte, Nährstoffe) zwischen Grenzfläche und Lösung führen kann, die für das Bakterienleben nicht gleichgültig zu sein brauchen. (Siehe hierzu *Wo. Ostwald*, diese Zeitschr. **100**, 279, *Neuberg*, ebenda **96** u. **98**, **100**, 289.) Welche Rolle Körper mit großer Oberfläche wie Kohle auf chemische Prozesse haben, hat besonders auch *Warburg* gezeigt (Verbrennung von Oxalsäure zu Kohlensäure, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **155**, 547. 1914), *Warburg* und *Naegelein* (Oxydation von Cystin, diese Zeitschr. **113**, ebenda *119*).

Was zunächst die Rolle des Sauerstoffs anbelangt, so kann sowohl die Verminderung in der Lösung einerseits, anderseits seine Anreicherung an der Grenzfläche für die Bakterien wirksam sein. Die Verminderung des Sauerstoffgehalts in der Lösung ist zur Züchtung anaerober Bakterien in Bouillon bei Luftzutritt benutzt worden (durch Zusatz von Organ- und Kartoffelstückchen, Watte, Metallpulver usw.[1]).

Daß auch die Anreicherung des Sauerstoffs (und des für Azotobacter als Nährstoff in Betracht kommenden Luftstickstoffes) an Grenzflächen (von Kieselsäure) für Bakterien von Bedeutung sein kann, hat *Söhngen* l. c. bei der Züchtung von B. acotobacter in einer Lösung gezeigt, die als Nährquelle nur ein Kohlehydrat enthielt.

Bei B. coli zeigen nun die Atmungsfiguren *Beijerincks* 2 Sauerstoffoptima und nach *Porodko*, Jahrb. f. wiss. Botan. können Kolibakterien bei einer Sauerstoffspannung von 0—4 Atmosphären gedeihen. Doch hängt das Sauerstoffbedürfnis der Bakterien stark von der Nährlösung ab[2]). (Für Koli siehe *Verzar* und *Bögel*, diese Zeitschr. **91**; auch *Gott-*

---

[1]) *Tarozzi*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I Orig. **38**, 619; *Wrzosek*, ebenda **44**, 607; *Pfuhl*, ebenda **44**, 378; *Hata*, ebenda **46**, 549. 1908. (Dabei ist es interessant, daß *Hata* bei der Züchtung von Tetanus mit gelösten reduzierenden Stoffen wie Natriumsulfit, nur Erfolg hatte, wenn er gleichzeitig Agarstückchen zusetzte; auch bei Ferrosulfat durfte er den Niederschlag, der durch den Zusatz entstanden war, nicht abfiltrieren, sonst ließ sich kein Wachstum erzielen.

[2]) Bisweilen auch vielleicht von vorausgegangener Sauerstoffspeicherung seitens der Bakterien selber. *Pasteur*, Etude sur la bière 1876, hat gefunden, daß Hefepilze eine Menge von Sauerstoff zu speichern imstande sind, mit der sie nach *Beijerinck* auf 20—30 Generationen hinauskommen können, Zentralbl. f. Bakteriol. Abt. II. **2**, 41. Insofern lassen sich vielleicht auch die Beobachtungen deuten, daß eiweißfreie Nährlösungen ohne Zusatz von Suspensionen gute Gärungsresultate ergaben, wenn sie mit sehr alten Kolikulturen beimpft wurden, die ein stark schleimiges Aussehen boten. Vielleicht haben diese alten Kulturen Sauerstoff gespeichert und bedurften nicht des von den Suspensionen adsorbierten Sauerstoffes.

schlich, Gaswechsel von B. im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen *Kolle-Wassermann*). *Omelianski*, Zentralbl. f. Bakteriol. usw. **12**, 1903 hat gefunden, daß B. formicicus ameisensaure Salze in eiweißfreien Nährlösungen nur bei Sauerstoffzutritt vergären kann, während in Bouillon Sauerstoffzutritt unnötig ist. Für erhöhte Sauerstoffnot von Bakterien in eiweißfreien Nährlösungen sprechen auch die Versuche von *Braun* und *Kahn-Bronner*, l. c. Sie stellten fest, daß die Bakterien in ihrer eiweißfreien Nährlösung nur in flacher Schicht nahe dem Luftsauerstoff gut wachsen. Auch in eigenen Versuchen mit eiweißfreien Nährlösungen ohne Zusatz von Suspensionen zeigte sich in den kleinen Gärröhrchen eine starke Trübung durch Koliwachstum nur im offenen Röhrchenschenkel nahe der Luftgrenze. Dagegen blieb die Lösung im geschlossenen Schenkel ganz klar. Im Sinne der Sauerstoffwirkung könnten vielleicht auch die Versuche 7 und 8 Tabelle III sprechen und ebenso die Wirksamkeit der vorausgegangenen Durchlüftung in Versuch 5 Tabelle II. Doch sprechen die geringen Unterschiede der Versuche 1—3 und 4—6 Tabelle I u. II weniger in diesem Sinne. Die Beobachtung, daß geringe Mengen reduzierender Substanzen, wie phosphorigsaure und schwefligsaure Salze die gärungsfördernde Wirkung einer mit gelüfteter Kohle versetzten Nährlösung zu steigern imstande sind, ist zu vieldeutig, um in dieser Frage herangezogen zu werden.

In einigen Versuchen *Söhngens* wurde ferner durch selektive Ionenadsorption aus den Elektrolyten der Lösung an den Grenzflächen die $[H^{\cdot}]$ verändert und man hätte auch bei B. coli in einer solchen Änderung des Aciditäts- bzw. Alkalinitätsgrades eine wesentliche Rolle der Suspensionswirkung suchen können. Daß aber die Wasserstoffionenkonzentration hierbei nicht ausschlaggebend ist, zeigt Tabelle IV, nach der bei Lösungen, die durch ziemlich hohe Phosphatkonzentration einmal deutlich sauer, das andere Mal deutlich alkalisch gemacht sind, in beiden Fällen der Zusatz der Aufschwemmung gegenüber der entsprechenden Kontrolle eine starke Gärungsförderung bedingen kann, ohne daß er (wie mittels der colorimetrischen Bestimmung der $[H^{\cdot}]$ nach *L. Michaelis* sich feststellen ließ), die Wasserstoffionenkonzentration in irgendwie bemerkenswertem Maße gegenüber der Kontrolle änderte.

Verglich man aber die schon längere Zeit geimpften Nährlösungen mit und ohne Suspensionszusatz, so ergaben sich eigenartige Resultate. Während nämlich in den Nährlösungen ohne Zusatz der Aufschwemmungen bei keiner oder nur geringer Gasbildung die Säuerung sehr stark vorgeschritten war, hatte nach der gleichen Gärungszeit bei den suspensionshaltigen Nährlösungen bei recht erheblicher Gasbildung der Aciditätsgrad erst einen ungleich viel geringeren Betrag erreicht und erst im letzten Stadium bei abnehmender Gasbildungsgeschwindigkeit stieg auch bei den Lösungen mit Suspensionszusatz der Aciditätsgrad

Tabelle III. **Zur Rolle des Sauerstoffgehaltes (dabei wurde die bereits mit der Suspension versetzte und beimpfte Nährflüssigkeit einmal zur Verminderung des Sauerstoffgehaltes im „Gasdurchlüftungsapparat“ mit Wasserstoff** durchlüftet, das andere Mal zur Vermehrung des Sauerstoffgehaltes mit Sauerstoff).

Versuchs-Nr.	Molare Konzentration der verschied. gelösten Bestandteile der Nährlösung: Traubenzucker	Ammoniumchlorid	sekund. Natriumphosph.	primäres Natriumphosph.	Magnesiumsulfat	Kaliumchlorid	Natriumchlorid	Calciumchlorid	Art und Menge des Zusatzes berechnet auf 100 ccm Nährlösung	Durchleitung von	Dauer d. Gasdurchleitung Stdn.	Gebildete Gasmenge
												nach 36 / 72 / 96 Stunden
1	0,015	0,07	0,011	0,0028	0,00031	0,0084	0,12	0,00041	+ je 16,6 ccm dialysiert. 1,7% Kieselsäure*)	Wasserstoff	1/2	0,0 ccm / 0,2 ccm / 8,0 ccm
2	0,015	0,07	0,011	0,0028	0,00031	0,0084	0,12	0,00041		Sauerstoff	1/2	1,0 „ / 3,5 „ / 11,0 „
3	0,015	0,07	0,011	0,0028	0,00031	0,0084	0,12	0,00041		1/4 Sauerst. + 3/4 Wasserstoff**)	1/2 1/2	0,1 „ / 6,0 „ / 9,0 „
												n. 24 Stdn. / n. 40 Stdn.
4	0,027	0,1	0,013	0,0033	0,00037	0,01	0,177	0,0005	+ je 1,0 g Blutkohle***)	Wasserstoff	1	Spuren / 20 ccm
5	0,027	0,1	0,013	0,0033	0,00037	0,01	0,177	0,0005		Sauerstoff	1/2	„ / 23 „
6	0,027	0,1	0,013	0,0033	0,00037	0,01	0,177	0,0005		1/5 Sauerst. + 4/5 Wasserstoff**)	1/2 1	„ / 26 „
7	0,02	0,059	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	+ 12,5 ccm Kieselsäurepräparat I†)	—	—	nach 48 Stunden 0,0 ccm†)
8	0,02	0,059	0,013	0,0033	0,00038	0,01	0,14	0,0005	Vorbehandlung nach††)	—	—	nach 64 Stunden 12,1 ccm

*) Die Kieselsäure änderte während der Durchlüftung ihren Solzustand nicht. — **) Das soll bedeuten, daß 1/4 bzw. 1/5 der im Gärrohr befindlichen Nährsuspension vorher mit Sauerstoff, 3/4 bzw. 4/5 vorher mit Wasserstoff durchlüftet waren. (Es sollte auf diese Weise der Nährsuspension eine mittlere Dosis Sauerstoff zugeführt werden.) — ***) Nach dem Kohlenzusatz und vor der Colibeimpfung und Gasdurchleitung wird die Nährlösung zur besseren Austreibung adsorbierter Gase 1 Stunde lang im Gasdurchleitungsapparat im Dampftopf gekocht. — †) Dasselbe wohl infolge zu geringen Alterns noch nicht unmittelbar brauchbare Kieselsäurepräparat wie in Versuch 5 Tabelle II. ††) Es fällt auf, daß der Inhalt des „Gasdurchlüftungsgärrohrs“ in Versuch 7 ganz geruchlos war, während die in Berührung mit der Luft befindliche Absperrflüssigkeit in der Saftflasche, in der das „Gasdurchlüftungsgärrohr“ stand, stark nach Coligärung roch. In der Annahme, daß eventuell der Sauerstoffmangel das Ausbleiben der Gärung verursachte, wurde der Inhalt des Gärrohrs in einem viel Luft fassenden Kolben kurz geschüttelt und dann nach Neubeimpfung mit Bact. coli als Versuch 8 aufs neue zur Gärung angesetzt.

Tabelle IV.

Zur Rolle der Wasserstoffionenkonzentration bei der Wirkung der zugesetzten Aufschwemmungen auf die Gärgasbildung (Versuche in Gärungssacharimetern; Höhe des geschlossenen Gärschenkels 11 cm).

Versuchsnumm.	Molare Konzentration der verschiedenen Bestandteile der Nährlösung								Art und Menge des Zusatzes berechnet auf 10 ccm Nährlösung	Reaktion	Höhe der Gassäule im geschlossenen Gasrohrschenkel	
	Traubenzucker	Ammoniumchlorid	sekund. Natriumphosph.	primäres Natriumphosph.	Magnesiumsulfat	Kaliumchlorid	Natriumchlorid	Calciumchlorid			n. 38 Stdn.	n. 64 Stdn.
1	0,02	0,062	0,035	0,0035	0,0002	0,0043	0,06	0,00022	+ 0,0	alkal.	0,1 cm	0,3 cm
2	0,02	0,062	0,035	0,0035	0,0002	0,0043	0,06	0,00022	+ Blutkohle*)	"	4,3 "	4,6 "
3	0,02	0,062	0,035	0,0035	0,0002	0,0043	0,06	0,00022	+ 1,5 ccm Kieselsäurepräp. I	"	0,6 "	2,6 "
4	0,02	0,062	0,0156	0,021	0,0002	0,0043	0,06	0,00022	+ 0,0	sauer	0,1 "	0,5 "
5	0,02	0,062	0,0156	0,021	0,0002	0,0043	0,06	0,00022	+ Blutkohle*)	"	4,3 "	4,6 "
6	0,02	0,062	0,0156	0,021	0,0002	0,0043	0,06	0,00022	+ 1,5 ccm Kieselsäurepräp. I	"	0,1 "	0,1 "
											nach 48 Stunden	
7	0,014	0,065	0,042	0,0057	0,0003	0,008	0,11	0,00039	+ 0,0	alkal.	0,3 cm	
8	0,014	0,065	0,042	0,0057	0,0003	0,008	0,11	0,00039	+ 1,5 ccm Kieselsäurepräp. I	"	0,3 "	
9	0,014	0,065	0,021	0,023	0,0003	0,008	0,11	0,00039	+ 0,0	sauer	0,3 "	
10	0,014	0,065	0,021	0,023	0,0003	0,008	0,11	0,00039	+ 1,5 ccm Kieselsäurepräp. I	"	1,4 "	
											nach 36 Stunden	
11	0,02	0,09	0,042	0,0064	0,0004	0,01	0,22	0,00053	+ 0,0	alkal.	0,0 cm	
12	0,02	0,09	0,042	0,0064	0,0004	0,01	0,22	0,00053	Ferrum phosphor. albumin filtriert**)	"	1,4 "	
13	0,02	0,09	0,025	0,023	0,0004	0,01	0,22	0,00053	+ 0,0	sauer	0,0 "	
14	0,02	0,09	0,025	0,023	0,0004	0,01	0,22	0,00053	Ferrum phosphor. albumin filtriert**)	"	1,6 "	

*) Vorher mit Salzsäure extrahiert und häufig mit destilliertem Wasser nachgewaschen.

**) Der Gehalt der Nährlösung an Ferr. phosph. albumin. Merck mußte für diese Zwecke sehr gering sein, um nicht durch leicht gelblichen Farbton die colorimetrische Bestimmung der [H˙] zu stören.

erheblich an. Die Möglichkeit, daß Kohle, Kieselsäure und Ferrum phosphoricum, die zwar bei der noch nicht vergorenen Lösung die Wasserstoffionenkonzentrationen nicht verändert haben, dies vielleicht dadurch tun könnten, daß sie die durch die Gärung gebildeten organischen Säuren adsorbieren, ist nicht sehr wahrscheinlich; denn in diesem Falle müßte der Aciditätsgrad der durch Coli stark gesäuerten suspensionsfreien Nährlösungen nachträglich noch vermindert werden können dadurch, daß man diese mit der Suspension längere Zeit schüttelte. Dies traf aber nur in verschwindendem Maße zu. Dieses Schütteln geschah im Eiskeller, um einer nachträglichen Säurebildung seitens der Colibakterien vorzubeugen. Vielleicht erklärt sich das langsamere Zunehmen des Aciditätsgrades in den suspensionshaltigen Nährlösungen dadurch, daß die Suspensionen das Verhältnis zwischen Säure und Gasbildung zugunsten der letzteren verschieben. Jedoch bedürfen diese vorläufigen Beobachtungen noch einer weiteren Untersuchung.

Außer der Elektrolytadsorption kommt aber auch noch die Adsorption der durch die Gärung gebildeten schädlichen Stoffwechselprodukte und besonders der Gase in Frage. Diese zeigt sich, wenn die Übersättigung an letzteren genügend groß geworden ist, daran, daß sich an den Suspensionspartikelchen Gasbläschen bilden. Wenn nämlich die Gärung im vollen Gange ist, so steigen aus der abgesetzten Flockenmasse (sei es nun Kohle, Kieselsäure oder Ferrum phosphoricum) unentwegt kleine Gasperlen hervor oder heben sogar die Flöckchen in der Flüssigkeit in die Höhe bis zu dem Flüssigkeitsspiegel, der die Gärgase von der Nährlösung trennt. (Es erinnert dies Bild fast an eine siedende Flüssigkeit, der zur Verhinderung des Siedeverzuges kleine Glas- oder Bimssteinstückchen zugesetzt sind, wobei sich die Dampfblasen vorwiegend an den Glasstückchen entwickeln.) *Söhngen*, Zentralbl. f. Bakteriol. usw. 2, 641. 1913, sucht in dieser Rolle der Suspensionen eine weitere Erklärung für ihre gärungsfördernde Wirkung. Er glaubt, daß durch die Ansammlung von Gasblasen an der Grenzfläche der aufgeschwemmten Teilchen die Gärungsflüssigkeit vor Übersättigung mit Kohlensäure geschützt werde[1]).

---

[1]) Vielleicht läßt sich auch die häufig beobachtete, bei der Behandlung der Rolle des Sauerstoffes erwähnte günstigere Bakterienentwicklung in der Luftoberfläche benachbarten Teilen der Nährlösung mit der durch die Nähe der Luftoberfläche erleichterten Gasentbindung in Zusammenhang bringen. Auch die Beobachtung, daß die Gärgasbildung häufig plötzlich in dem Moment einsetzt, in dem ein Teil des Soles ausflockt, hängt vielleicht mit einer erleichterten Gasentbindung zusammen, indem entweder die Dispersitätsverminderung als auslösender Faktor für die Entbindung der übersättigten Gärgase wirkt, oder in dem infolge der mit dem Ausflocken einhergehenden Verkleinerung der gasadsorbierenden Oberfläche diese nicht mehr so viel Gas binden kann wie vorher und es so zur Gasentbindung kommt.

Auch die Bakterien sammeln sich häufig an der Grenzfläche der suspendierten Partikelchen an. So ließ sich häufig beobachten, daß die ausfallende Kieselsäure die gebildete Bakterientrübung dadurch völlig klärte, daß sie die Bakterien adsorbierte und mit zu Boden riß. Die Wirkung der Kohle ist ähnlich. Ob die Anreicherung von Traubenzucker und Ammoniumsalzen an den Grenzflächen eine gärungsfördernde Rolle spielte, ließ sich aus den Versuchen mit Variation der Konzentration beider Stoffe nicht deutlich ersehen.

Aber es gab noch eine andere Erscheinung, die vielleicht auch von Bedeutung für die Gärungsförderung sein konnte, aber wohl weniger auf Adsorption als auf der Viscosität der Sole zu beruhen scheint; so kam es vor, daß in den Fällen, in denen ein Teil der Kieselsäure noch nicht zu Flocken geballt ausgefallen war, die Bakterien sich als bürstensaumartige, den Zusammenhang wahrende, in der Nährlösung schwebende Kolonien entwickelten. Diese Kolonien sahen ähnlich aus wie etwa eine Agarstichkultur von Schweinerotlauf. Diese Erscheinung trat bisweilen auch bei den mit Agar-Agar versetzten Nährlösungen ein und war fast stets der Vorbote stark einsetzender Gasbildung und des Ausfallens der Kieselsäure. Vermutlich war in diesen Fällen die Agar-Agarlösung bzw. die Lösung der nicht ausgefallenen Kieselsäure so viskös, daß sie dem Auseinandergehen der Colitochterkeime Widerstand entgegensetzte. Diesen Bürstensaumkolonien ebenso wie der Adsorption der Bakterien an den Suspensionspartikeln ist es gemeinsam, daß die Bakterien nicht frei vereinzelt in der Nährlösung schwimmen, sondern zu größeren Mengen zusammenhaften. Daß der Stoffwechsel dicht zusammengedrängter Bakterienmassen, deren Stoffwechselprodukte sich natürlich stärker anhäuften, eventuell anders verlaufen kann als der Stoffwechsel von einzelnen frei in der Nährlösung schwebenden Bakterien, ist durchaus möglich.

Zusammenfassung.

Es wurde festgestellt, daß Aufschwemmungen verschiedener fein verteilter Körper, wie Kohle, Kieselsäure, Ferrum phosphoricum, einen hervorragend günstigen Einfluß auf die Gärgasbildung von Bact. coli in eiweißfreien Nährlösungen haben können. Dieser günstige Einfluß zeigt sich ebenso bei leicht alkalischer als auch bei leicht saurer Reaktion der Ausgangslösungen. Die Wirksamkeit dieser Aufschwemmungen beruht wahrscheinlich auf ihrer starken Oberflächenentwicklung und damit in Zusammenhang stehenden Adsorptionsvorgängen; und zwar scheinen diese Aufschwemmungen günstig besonders dadurch zu wirken, daß sie die für die Bakterien wohl ungünstige Übersättigung der Nährlösung mit den Gärgasen aufheben, indem sie diese an ihrer Oberfläche zu Gasblasen vereinigen.

Über die Steigerung der Schnelligkeit und Intensität der Giftwirkung einiger Gruppen giftig bzw. pharmakologisch wirkender Stoffe auf Bakterien und Kaulquappen durch Variation des Aciditäts- bzw. Alkalinitätsgrades.

Ein Beitrag zu der Frage der Permeabilität.

Von

Richard Labes.

(Eingegangen am 24. Februar 1922.)

Die Fällungswirkung einer Reihe von Alkaloidsalzen einerseits und den Salzen von pharmakologisch wirksamen Säuren andererseits auf Eiweißkolloide wie denaturiertes Serumalbumin ist von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Es besteht nämlich ein Flockungsoptimum bei einer für die verschiedenen Alkaloide bei verschiedenen Konzentrationen verschiedenen Wasserstoffionenkonzentration, so daß man sowohl bei Steigerung der Acidität als auch der Alkalinität eine Verminderung der Flockung erreichen kann (*L. Michaelis* u. *A. v. Szent-Gyorgyi*, Biochem. Zeitschr. **103**, 178, 1919; *Labes*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 1920). Dieses Flockungsoptimum ist gegenüber dem isoelektrischen Punkt bei Wirksamkeit der Anionen nach der sauren Seite, bei wirksamen Kationen nach der alkalischen Seite verschoben.

Wäre nun der Wirkungsmechanismus giftiger Elektrolyte auf lebende Organismen nur abhängig von derartigen Fällungsvorgängen auf Eiweißkolloide, so müßte man ein Optimum der Wirkung bei einem bestimmten Aciditäts- bzw. Alkalinitätsgrad erwarten und sowohl bei weiterer Steigerung der Alkalinität als auch bei Steigerung der Acidität ein Abnehmen der Giftwirkung feststellen.

Über den Einfluß der alkalischen und sauren Reaktion auf die Wirkung von Alkaloiden liegen einige Arbeiten vor.

J. Traube, Diese Zeitschr. **42**, 470; **98**, 177. 1919, hat die Alkaloidempfindlichkeit von einer Reihe von Organismen, auch Kaulquappen, untersucht und hat gefunden, daß die Empfindlichkeit zunahm, wenn er die Alkaloidlösungen durch Zusatz von Natriumcarbonat alkalischer machte. *Traube* deutet diese Erscheinung in folgender Weise: Das in Alkaloidkation und Säureanion zerfallende Alkaloidsalz wird durch die OH-Anionen zu desto größeren Teilen in die unelektrische Alkaloidbase verwandelt, je größer die Konzentration der OH-Ionen ist. Die Alkaloidbase hat aber andere physikalische Eigenschaften als das Alkaloid-

kation. Erstens ist sie in den meisten Fällen oberflächenaktiv, d. h. sie erniedrigt die Oberflächenspannung einer Grenzfläche, und so glaubt *Traube*, daß die Wirkung der Alkaloidbase auf die Zellen auf ihre oberflächenspannungerniedrigende Wirkung auf die Zelloberfläche größtenteils zurückzuführen ist. Die Alkaloidbase hat aber außer der höheren Oberflächenaktivität auch noch eine stärkere Lipoidlöslichkeit als das Alkaloidkation. Man kann dies auch daran ersehen, daß man Alkaloidlösungen bei saurer Reaktion, bei der das Alkaloid vorwiegend als Kation in Lösung ist, nicht mit Äther ausschütteln kann; dagegen nimmt bei Alkalizusatz, der das Alkaloid in die lipoidlösliche Base verwandelt, der Äther meist außerordentlich leicht das Alkaloid in sich auf. Infolgedessen könnten die *Traube*schen Beobachtungen größtenteils ebensogut durch die Lipoidtheorie von *Meyer-Overton* erklärt werden, die die Zelloberfläche als Lipoidschicht annimmt, durch die das Gift nur dann ins Innere dringen kann, wenn es lipoidlöslich ist. So hat auch schon *Overton*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **22**, 189. 1897, gezeigt, daß die Alkalisierung der Alkaloidlösungen durch Natriumcarbonat ihre Wirkung auf die Organismen außerordentlich steigert. Auch die hämolytischen Versuche von *Goldschmidt* und *Pribram*, Arch. f. exp. Pathol. u. Therap. **6**, 1. 1909, und *Pribram*, Wien. klin. Wochenschr. 1921, Nr. 91, sprechen in diesem Sinne. Über den Einfluß von Alkali und Säurezusatz auf Chininderivate liegen auch sehr interessante Beobachtungen von *Morgenroth* und *Tugendreich* vor, diese Zeitschr. **79**, 257. 1917 sowie *Bieling*, diese Zeitschr. **85**, 1888—1918 und Zeitschr. f. Immunitätsforschung u. exp. Therap. Orig. **27**, H. 1 und 2. 1918. *Gros*, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **63**, 80. 1910 und Münch. med. Wochenschr. 1910, S. 2042 hat mit Quaddelversuchen gezeigt, daß die Novocainanästhesie durch Natriumcarbonatzusatz zu steigern ist[1]).

Bei einigen Versuchen über die Empfindlichkeit von Paramäcien gegen Alkaloide war ich vor langer Zeit auf ähnliche Verhältnisse gestoßen (vgl. auch *Rona* und *Bloch*, diese Zeitschr. **119**, Chininwirkung auf Paramäcien) und hatte mir vorgenommen, diese Erscheinungen mit Reaktionsregulatoren zu prüfen, mit denen man es besser als mit Natriumcarbonat in der Hand hat, eine berechenbare Abstufung von Aciditäts- und Alkalinitätsgraden herzustellen, die eine besonders gute Übersicht über die in Frage kommenden Erscheinungen erlaubt und eventuell vorkommende Maxima (wie sie bei den erwähnten Kolloidflockungen aufgetreten sind) zeigen müßten. (Derartige Maxima haben sich aber nicht gezeigt.) Für diese Untersuchungen erschienen mir besonders geeignet Gemische von primärem und sekundärem Natriumphosphat sowie von Natriumacetat und Essigsäure (siehe *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration. Julius Springer, Berlin 1914). Außerdem schien es mir gut, zu zeigen, daß nicht etwa die alkalische Reaktion die Gewebe als solche giftempfindlicher machte, indem ich außer den Versuchen mit Alkaloiden auch Stoffe benutzte, die gerade umgekehrt bei saurer Reaktion vorwiegend als lipoidlösliche bzw.

[1]) In den letzten Tagen erschien in der klinischen Wochenschrift 11. II. 1922 eine vorläufige Mitteilung von *L. Michaelis*: Die Abhängigkeit der Wirkung der Chinaalkaloide auf Bakterien von der Alkalität, und von *Vermaast*, diese Zeitschr. **125**, 113, Zur Theorie der Desinfektion im Sinne der *Meyer-Overton*schen Lipoidtheorie (behandelt im wesentlichen benzoesaure und salicylsaure Salze). Beide sehr ausführliche Arbeiten sprechen ebenfalls in diesem Sinne.

oberflächenaktive Moleküle in Lösung waren, z. B. benzoesaures und buttersaures Natrium, die bei geringem H-Ionengehalt als lipoidunlösliche und wenig oberflächenaktive Anionen auftreten, während bei zunehmendem Wasserstoffionengehalt das benzoe- bzw. buttersaure Anion zur lipoidlöslichen und oberflächenaktiven Benzoe- bzw. Buttersäure entladen werden. Bei diesen Stoffen mußte also die Giftwirkung bei saurer Reaktion stärker und schneller eintreten als bei alkalischer Reaktion. Tatsächlich war bei diesen und anderen Stoffen mit den gleichen physikalischen Eigenschaften, wie die Versuche zeigten, diese Forderung auch erfüllt. Ferner erforderte diese Anschauung, daß bei lipoidlöslichen und oberflächenaktiven Körpern, deren Lipoidlöslichkeit und Oberflächenaktivität sich durch Abstufung der Wasserstoffionenkonzentration nicht änderte, die Giftempfindlichkeit sowohl bei saurer wie bei alkalischer Reaktion die gleiche war. Auch diese Vermutung bestätigte sich in vollem Maße.

Die Untersuchungen wurden zuerst mit einigen Alkaloidsalzen bei Paramäcien, dann bei Staphylokokken durchgeführt und bestätigten vollauf die obigen Anschauungen, und zwar wirkten Alkaloide desto schneller und stärker wachstumsbeeinträchtigend auf Staphylokokken, je alkalischer die Lösung reagierte, d. h. ein je höherer Bruchteil der lipoidlöslichen und oberflächenaktiven Alkaloidbase in der Lösung vorhanden war. Umgekehrt wirkte das salicylsaure und das benzoesaure Natrium desto stärker wachstumsschädigend, je saurer die Lösung war, d. h. ein je größerer Prozentsatz von dem salicylsauren bzw. benzoesauren Natrium als lipoidlösliche und oberflächenaktive Salicylsäure bzw. Benzoesäure in Lösung war. Ein Optimum der Giftwirkung bei einer mittleren Wasserstoffionenkonzentration war also nicht zu finden.

Bei Paramäcien und Staphylokokken waren aber die Erscheinungen zunächst nicht eindeutig; denn die Organe der Paramäcien und Staphylokokken, die durch die Giftwirkung betroffen sein konnten, konnten auch an der Oberfläche liegen, so daß man über das Eindringen des Giftes in das Innere aus der Schnelligkeit und Intensität der Giftwirkung nicht beweisende Schlüsse ziehen konnte. Um hierüber Näheres aussagen zu können, führte ich weitere Versuche mit Kaulquappen aus. Bei den Vergiftungsversuchen mit Kaulquappen war es stets deutlich zu erkennen, daß die Wirkung der Gifte tatsächlich die inneren Organe, und zwar insbesondere das Nervensystem der Kaulquappe betroffen hatte, daß also das Gift durch Haut, Darm oder Kiemen in die Blutbahn der Kaulquappe durchgedrungen war und von dieser aus zu den inneren Organen gelangte. Ferner ist ein Vorteil der, daß die höchste Wahrscheinlichkeit dafür spricht, daß die Wasserstoffionenkonzentrationen in der Blutbahn auch bei Kaulquappen ähnlich wie bei anderen höheren

Wirbeltieren während des Lebens durch die Reaktion der Außenflüssigkeit nicht oder nur sehr wenig beeinflußt wird (vgl. auch *Höber*, Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe). Daher unterschied sich das Blut der Kaulquappen in der am meisten alkalischen und in der sauersten Versuchslösung im wesentlichen nur durch die Konzentration der durch innere und äußere Körperbedeckung eingedrungenen Gifte. Bei den Kaulquappen zeigten sich wieder dieselben Abstufungsreihen der Intensität und Schnelligkeit der Giftwirkung wie bei den Paramäcien und Staphylokokken; daraus ergibt sich also, daß die Schnelligkeit und Stärke der Giftwirkung bei den Kaulquappen nur davon abhängt, ein wie großer Teil des Giftes und mit welcher Schnelligkeit er von der Versuchslösung durch die Körperbedeckungen in die Blutbahn gedrungen ist; daß es sich also bei diesen Versuchen im wesentlichen um ein Problem der Stoffaufnahme bzw. der Permeabilität in das Innere der Organismen bei den Kaulquappen bzw. der Zellen bei den Bakterien und Paramäcien handelt. Über den weiteren Wirkungsmechanismus des eingedrungenen Giftes erlauben diese Versuche daher keine Schlüsse.

(Die an sich schon unwahrscheinliche Möglichkeit, daß die gesteigerte Alkaloidwirkung in Phosphatlösungen mit höherer [OH'] auf einer gesteigerten Bildung von etwa wirksamem Alkaloidphosphat beruhen könne, ließ sich dadurch ausschließen, daß stark gesteigerter Phosphatgehalt bei gleicher [OH'] dann infolge vermehrten Alkaloidphosphatgehaltes gesteigerte Giftwirkung hätte hervorrufen müssen, was nirgends der Fall war.)

Daß diese Erscheinungen zum Teil schon eine praktische Verwendung in der Pharmakologie und Desinfektion gefunden haben, wurde schon gesagt. Erwähnt sei auch die häufige schädliche Nebenwirkung des salicylsauren Natrons, die wohl auf der stark sauren Reaktion des Magensaftes beruht, die das Eindringen des Giftes in Form der lipoidlöslichen Säure in die Magenschleimhaut begünstigt, und die durch die Neutralisationswirkung von Natriumbicarbonat abgeschwächt werden kann. Möglich ist es auch, daß die entgiftende Bildung von Ätherschwefelsäuren aus Scatol, Indol und ähnlichen Fäulnisprodukten des Darmes die Bedeutung hat, aus lipoidlöslichen und schnell aus dem Blut in die Zellen dringenden und deren Stoffwechsel störenden aromatischen Körpern die Sulfosäuren zu bilden, die bei der Reaktion der Säfte des Organismus dissoziiert und lipoidunlöslich sind und daher wohl nicht so leicht in die Zellen eindringen können.

Versuchstechnik.

Die Versuche mit Kaulquappen wurden in der Weise vorgenommen, daß die mit der gleichen Giftlösung versetzten Phosphatgemische verschiedenen Aciditäts-

bzw. Alkalinitätsgrades[1]) in eine Reihe von Glaströgen gegossen wurden, und dann gleichzeitig in diese Tröge eine Anzahl von Kaulquappen der gleichen Art und von gleichem Alter zugesetzt wurden. Dann wurde die Schnelligkeit des Eintretens der Giftwirkung protokolliert. Die Giftwirkung zeigte sich meist in folgender Reihenfolge:

Nach Vorübergehen eines kurzen Erregungszustandes hört das spontane Schwimmen auf. Es folgt Mattigkeit, auf Berührung des Schwanzes nur träges Wegschwimmen als Reaktion, dann völliges Wegbleiben der Schwimmreaktion (im Protokoll als Reaktionsschwimmen bezeichnet). In diesem Stadium erfolgt auf Kneifen des Schwanzes nur noch leichtes Schwänzeln (im Protokoll als Reaktionsschwänzeln vermerkt). Dann erlischt jegliche Reaktion auch auf grobe Reize. Bei den meisten Alkaloiden war die Vergiftung reversibel, indem sich die Kaulquappen in frischem Wasser schnell erholten; ebenso war es bei den nicht dissoziierbaren neutralen Giften. Dagegen ist es mir nicht gelungen, lipoidlöslich Säuren zu finden, deren Giftwirkung reversibel war. Mit Kaulquappen verschiedenen Alters zeigten sich immer die gleichen Gesetzmäßigkeiten in der Reihenfolge der Vergiftungsgeschwindigkeit bei den verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen. Dies war sogar bei den jüngsten Kaulquappen der Fall, die gerade mit deutlichen äußeren Kiemen aus dem Laich ausgeschlüpft waren und von ihrem Dotter lebend, den Verdauungstractus noch nicht zu verwenden schienen. Individuelle Verschiedenheiten innerhalb der Kaulquappen eines Troges waren nur ausnahmsweise zu bemerken. In diesen Ausnahmefällen sind in den Protokollen Prozentzahlen angegeben.

Bei den Bakterienversuchen wurde der Aciditätsgrad durch Gemische von Natriumacetat und Essigsäure variiert, und zwar ging der Aciditätsgrad dem Quotienten der Konzentration von Essigsäure : Natriumacetat proportional, d. h. je größer die relative Menge der Essigsäure war, desto saurer reagierte die Lösung. Mit dem Verhältnis Natriumacetat zu Essigsäure 1 : 1 erreichte die Wasserstoffionenkonzentration etwa den Wert $[H^{\cdot}] = 2 \cdot 10^{-5}$. Durch Vervielfachung des Natriumacetatgehaltes läßt sich die $[H^{\cdot}]$ um das entsprechende Vielfache abschwächen, die Verwendbarkeit der Natriumacetatessigsäuregemische reicht aber nicht in das alkalische Gebiet hinein.)

Die verschieden sauren Natriumacetatessigsäuregemische wurden steril in Reagensgläsern mit gleichen Mengen Giftlösung versetzt und dann in jedes Reagensrohr die gleiche Menge einer dichten Aufschwemmung von einer Schrägagarkultur von Staphylococcus aureus zugesetzt. Nach verschiedener Gifteinwirkungsdauer wurden dann gleich geringe Mengen (0,1 ccm bzw. in anderen Versuchsreihen 0,2 ccm) der verschiedenen gifthaltigen Bakteriensuspensionen in Röhrchen mit gleichen Mengen von Bouillon oder „Natriumacetatbouillon" — um die Wirkung der mit den geringen Flüssigkeitsmengen evtl. mit übertragenen Essigsäure abzustumpfen, wurde auf 45 ccm Bouillon 5 ccm einer normalen Natriumacetatlösung verwendet — übertragen und nach gleichen Zeiten im Brutschrank die Bakterientrübung verglichen. Es bedeutet ein Strich das völlige Klarbleiben der Bouillon (das im Sinne der größten Schädigung der Bakterien gedeutet wird), die Zahl der Kreuze kennzeichnet die Intensität der Bakterientrübung.

[1]) Bei dem Verhältnis der Konzentration von primärem zu sekundärem Natriumphosphat 1 : 2 erhält man etwa die Wasserstoffionenkonzentration des Neutralpunktes; ist der relative Gehalt des primären Phosphates *n* mal so groß bzw. *n* mal so klein, so ist die $[H^{\cdot}]$ innerhalb eines weiten Bereiches entsprechend *n* mal so groß bzw. *n* mal so klein. Man kann daher mit diesen Gemischen sowohl saure als auch alkalische Reaktion bestimmten Grades darstellen.

Tabelle I.

Verschiedenheit der Wachstumshemmung von Staphylokokken in Bouillon durch vorausgehende Einwirkung einer Giftlösung, deren Aciditätsgrad durch variierten Gehalt von Natriumacetatlösung und Essigsäure abgestuft ist. (Die Richtung der Pfeile kennzeichnet die Zunahme der Acidität.)

	Zusammensetzung der giftigen Lösung: Natriumacetat ccm	Essigsäure ccm	Destilliertes Wasser ccm	Dauer und Temperatur der Gifteinwirkung: Std.	Grad	Vermehrung der Bakterien in Natriumacetatbouillon nach		
	normal	normal				Nach 24 Stunden	Nach 36 Stunden	
↓ + je 2,0 ccm 1/[illegible] molar *Natrium-benzoicum*	1,12	0,0	0,38	12	5	+ + + +	+ + + + + +	
	1,05	0,14	0,3	12	5	+ + + +	+ + + + + +	
	1,0	0,25	0,25	12	5	+ + +	+ + + + + +	
	0,9	0,45	0,15	12	5	+ +	+ + + + + +	
	0,75	0,75	0,0	12	5	− *)	+	
↓ + je 2,0 ccm 1/[illegible] molar *Natrium-salicylicum*	1,12	0,0	0,38	12	5	+ + + +	+ + + + + +	
	1,05	0,14	0,3	12	5	+	+ + + + + +	
	1,0	0,25	0,25	12	5	+	+ + + + + +	
	0,9	0,45	0,15	12	5	−	+ + +	
	0,75	0,75	0,0	12	5	− *)	−	
	0,5 normal ccm	0,5 normal ccm				Nach 15 Stunden	Nach 20 Stunden	Nach 36 Stunden
↓ + je 2,0 ccm einer 5 proz. Losung von *Chininum* hydrochlorium	1,12	0,0	0,38	$1^1/_2$	36	-	−	+ + + + +
	1,05	0,14	0,3	$1^1/_2$	36	+ + + +	+ + + + +	+ + + + + +
	1,0	0,25	0,25	$1^1/_2$	36	+ + + + +	+ + + + + +	+ + + + + +
	0,9	0,45	0,15	$1^1/_2$	36	+ + + + + +	+ + + + + +	+ + + + + +
	0,75	0,75	0,0	$1^1/_2$	36	+ + + + + +	+ + + + + +	+ + + + + +
						Nach 30 Stunden	Nach 48 Stunden	
	1,12	0,0	0,38	$2^1/_2$	36	−	−	
	1,05	0,14	0,3	$2^1/_2$	36	+ + + + + +	+ + + + + +	
	1,0	0,25	0,25	$2^1/_2$	36	+ + + + + +	+ + + + + +	
	0,9	0,45	0,15	$2^1/_2$	36	+ + + + + +	+ + + + + +	
	0,75	0,75	0,0	$2^1/_2$	36	+ + + + + +	+ + + + + +	
						Nach 28 Stunden	Nach 44 Stunden	
	1,12	0,0	0,38	5	36	−	−	
	1,05	0,14	0,3	5	36	+ + +	+ + + + +	
	1,0	0,25	0,25	5	36	−	+ + + +	
	0,9	0,45	0,15	5	36	− **)	− **)	
↓	0,75	0,75	0,0	5	36	−	−	
						Nach 15 Stunden	Nach 20 Stunden	Nach 36 Stunden
↓ + je 2,0 ccm einer 0,5 proz. Losung von *Optochinum* hydrochloricum	1,12	0,0	0,38	$1^1/_2$	36	−	−	-
	1,05	0,14	0,3	$1^1/_2$	36	−	−	-
	1,0	0,25	0,25	$1^1/_2$	36	−	(+)	+ + + + +
	0,9	0,45	0,15	$1^1/_2$	36	(+)	+ +	+ + + + +
	0,75	0,75	0,0	$1^1/_2$	36	(+)	+ + + +	+ + + + +
						Nach 30 Stunden	Nach 48 Stunden	
	1,12	0,0	0,38	$2^1/_2$	36	−	−	
	1,05	0,14	0,3	$2^1/_2$	36	−	−	
	1,0	0,25	0,25	$2^1/_2$	36	+ + + + +	+ + + + + +	
	0,9	0,45	0,15	$2^1/_2$	36	+ + + + +	+ + + + + +	
↓	0,75	0,75	0,0	$2^1/_2$	36	+ + + + +	+ + + + + +	

*) Kontrollen mit Gemischen von Natriumacetat und Essigsäure ohne Giftzusatz wie auch die Chinin- und Optochinreihen zeigen, daß die Acidität des Essigsäure reichsten Gemisches als solche nach dieser Einwirkungszeit nicht imstande ist, das nachträgliche Wachstum zu unterdrücken.

**) Bei dieser langen Einwirkung der gifthaltigen Flüssigkeit machen sich die höheren Säuregrade auch als solche schädlich bemerkbar, so daß sich hier die vom alkalischsten zum sauersten Gemisch abnehmende Alkaloidwirkung und die vom sauersten nach dem alkalischsten Gemisch abnehmende Wirkung des Aciditätsgrades überdecken.

Tabelle I (Fortsetzung).

	Zusammensetzung der giftigen Lösung: Natriumacetat ccm	Essigsäure ccm	Destilliertes Wasser ccm	Dauer und Temperatur der Gifteinwirkung: Std.	°C.	Vermehrung der Bakterien in Natriumacetatbouillon nach		
	0,5 normal	0,5 normal				Nach 28 Stunden	Nach 44 Stunden	
+ je 2,0 ccm einer 0,5 proz. Lösung von *Optochinum* hydrochloricum	1,12	0,0	0,88	5	36	–	–	
	1,05	0,14	0,8	5	36	–	–	
	1,0	0,25	0,25	5	36	–	–	
	0,9	0,45	0,15	5	36	+ + + + + **)	+ + + + + **)	
	0,75	0,75	0,0	5	36	(+)	+	
						Nach 15 Stdn.	Nach 20 Stdn.	Nach 36 Stdn.
	1,12	0,0	0,88	1½	36	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + + +
	1,05	1,14	0,8	1½	36	–	–	+ + + +
	1,0	0,25	0.25	1½	36	–	–	–
	0,9	0,45	0,15	1½	36	–	–	–
	0,75	0,75	0,0	1½	36	–	–	–
						Nach 30 Stunden	Nach 48 Stunden	
+ je 2,0 ccm einer 0,23 molaren Lösung von Natrium *salicylicum*	1,12	0,0	0,88	2½	36	+ + + +	+ + + + +	
	1,05	0,14	0,8	2½	36	(+)	+ + +	
	1,0	0,25	0,25	2½	36	–	–	
	0,9	0,45	0,15	2½	36	–	–	
	0,75	0,75	0,0	2½	36	–	–	
						Nach 28 Stunden	Nach 44 Stunden	
	1,12	0,0	0,88	5	36	+ +	+ + + +	
	1,05	0,14	0,8	5	36	+	+ + +	
	1,0	0,25	0,25	5	36	–		
	0,9	0,45	0,15	5	36	–		
	0,75	0,75	0,0	5	36	–		
						Nach 16 Stunden		
+ je 2,0 ccm 0,5‰ *Eucupinotoxinum* hydrochloricum	1,0	0,0	0,5	1½	36	–		
	1,0	0,25	0,25	1½	36	–		
	1,0	0,5	0,0	1½	36	+		
+ je 2,0 ccm einer 0,11 mol. Lös. von Natr. *benzoicum*	1,0	0,0	0,5	1½	36	+ + + + +		
	1,0	0,25	0,25	1½	36	–		
	1,0	0,5	0,0	1½	36	–		
						Nach 20 Stunden		
+ je 2,0 ccm einer 0,25 proz. Lösung von *Optochinum* hydrochloricum	1,0	0,0	0,5	2	36	–		
	1,0	0,25	0,25	2	36	+		
	1,0	0,5	0,0	2	36	+		
+ je 2,0 ccm einer 0,05 proz. Lösung von *Eucupinotoxinum* hydrochloricum	1,0	1,0	0,5	2	36	–		
	1,0	0,25	0.25	2	36	+ +		
	1,0	0,5	0,0	2	36	+ + + +		
+ je 2,0 ccm einer 0,005‰-Lösung von *Eucupinotoxinum* hydrochloricum	1,0	0,0	0,5	2	36	–		
	1,0	0,25	0,25	2	36	+ + + + +		
	1,0	0,5	0,0	2	36	+ + + + +		

**) Bei dieser langen Einwirkung der gifthaltigen Flüssigkeit machen sich die höheren Säuregrade auch als solche schädlich bemerkbar, so daß sich hier die vom alkalischsten zum sauersten Gewicht abnehmende Alkaloidwirkung und die vom sauersten nach dem alkalischsten Gemisch abnehmende Wirkung des Aciditätsgrades überdecken.

Bemerkungen zu Tabelle I: Bei den Salzen der Alkaloidbasen ist also das Wachstum der Bakterien durch vorausgehende Einwirkung in Lösungen mit der am stärksten alkalischen bzw. am wenigsten sauren Reaktion besonders unterdrückt, während umgekehrt bei den Salzen der Benzoesäure und der Salicylsäure gerade die sauerste Reaktion die Wachstumsschädigung am meisten begünstigt.

Tabelle 11.

Verhalten von Kaulquappen in Lösungen von Salzen mit wirksamem Kation, deren Einfluß sich desto schneller und intensiver zeigt, je alkalischer die Lösung durch gesteigerten relativen Zusatz von sekundärem Natriumphosphat gemacht ist. (Die Richtung der Pfeile kennzeichnet die Zunahme des Aciditätsgrades.)

	Natriumphosphatlösung sekund. 0,2 mol.	Natriumphosphatlösung prim. 0,2 mol.		Destilliertes Wasser ccm	Beeinflussung des Verhaltens nach angegebener Zeit			
					Nach 10 Minuten	Nach $2^{1}/_{2}$ Stunden		
↓	8,8	1,1	+ je 10,0 ccm einer 2 proz. Lösung von Atropinum sulfuricum	0,0	matt	völlig reaktionslos } kaum erholbar		
	5,0	5,0		0,0	munter	matt } kaum erholbar		
	0,65	9,5		0,0	munter	völlig munter		
					Nach 4 Minuten	Nach 7 Minuten	Nach 15 Minuten	Nach 15 Stunden
↓	8,8	1,1	+ je 2,0 ccm einer 5proz. Lösung von Cocainum hydrochloricum	16,0	völlig reaktionslos	völlig reaktionslos	völlig reaktionslos*)	völlig reaktionslos
	4,0	6,0		16,0	munter	mattes Reaktionsschwimmen	völlig reaktionslos*)	völlig reaktionslos
	0,2	9,5		16,0	munter	munter	munter	Schwimmen matt
					Nach 2 Stunden	Nach 5 Stunden		
↓	3,0	0,4	+ je 1,4 ccm einer 1proz. Lösung von Nicotin	24,0	reaktionslos*)	völlig reaktionslos		
	1,0	2,0		24,0	munter	als Reaktion nur noch Flimmern des Schwanzes		
	0,4	8,0		24,0	munter	gutes Reaktionsschwimmen		
					Nach 6 Stunden	Nach 8 Stunden	Nach 17 Stunden	
↓	8,0	2,0	+ je 4,0 ccm einer 0,5 molaren Lösung von Ammoniumchlorid	15,0	reaktionslos	völlig reaktionslos	reaktionslos	
	2,0	8,0		15,0	munter	sehr matt	fast alle reaktionslos **)	
	0,4	10,0		15,0	munter	munter	munter	
					nach 6 Stunden	Nach 15 Stunden		
↓	8,0	2,0	+ je 20,0 ccm einer 0,66 proz. Lös. von Trimethylamin. hydrochl.	5,0	80% der Exemplare reaktionslos	alle reaktionslos		
	2,0	8,0		5,0	alle munter	alle reaktionslos		
	0,4	10,0		5,0	alle munter	90% der Exemplare noch schwimm- bzw. reaktionsfähig		
					Nach 2 Minuten	Nach 4 Minuten	Nach 16 Minuten	
↓	8,0	2,0	+ je 2,0 ccm einer 2,5 proz. Lösung von Anilin. hydrochloricum	13,0	nur noch Zuckungen	reaktionslos*)	reaktionslos	
	4,0	6,0		13,0	angedeutetes Schwimmen	Zuckungen	reaktionslos*)	
	2,0	8,0		13,0	richtiges Schwimmen	angedeutetes Schwimmen	Zuckungen*)	
					Nach 12 Minuten	Nach 30 Minuten	Nach 1 Stunde	
↓	8,0	2,0	+ je 0,6 ccm einer 5 proz. Lösung von Novocain. hydrochlor.	4,0	reaktionslos*)	reaktionslos	reaktionslos	
	4,0	6,0		4,0	munter	reaktionslos*)	reaktionslos	
	2,0	8,8		4,0	munter	munter	reaktionslos*)	
					Nach 8 Stunden	Nach 5 Stunden	Nach 7 Stunden	
↓	8,0	2,0	+ je 7,2 ccm einer 5proz. Lösung von Pilocarpinum hydrochloricum	8,0	sehr matt	reaktionslos	reaktionslos	
	4,0	6,0		8,0	ziemlich munter	matt	reaktionslos	
	2,0	8,0		8,0	sehr munter	matt	50% der Exemplare schwimmen noch	

*) in frischem Wasser erholbar. **) in frischem Wasser nicht erholbar.

Tabelle III.

Verhalten von Kaulquappen in Lösungen von Salzen mit wirksamem Anion, deren Einfluß sich desto schneller und intensiver zeigt, je saurer die Lösung durch gesteigerten relativen Gehalt an primären Natriumphosphat gemacht ist. (Die Richtung der Pfeile kennzeichnet die Zunahme des Aciditätsgrades.)

	Natriumphosphatlösung sekund. ccm	Natriumphosphatlösung prim. ccm	Destilliertes Wasser ccm		Beeinflussung des Verhaltens nach angegebener Zeit				
	0,2 mol.	0,2 mol.			Nach 8½ Stunden				
	4,0	1,0	0,0	+ je 18,0 ccm 0,75 proz. Lösung von buttersaurem Kali	munter				
	1,0	4,0	0,0		sehr träge				
↓	0,2	5,0	0,0		reaktionslos				
					Nach 1 Stunde		Nach 2 Stunden		
	4,0	1,0	0,0	+ je 15,0 ccm einer 1 proz. Lösung von milchsaurem Natron	matt		90% der Exemplare zeigen noch Raktionsschwimmen		
	1,0	4,0	0,0		matter		50% völlig reaktionslos		
↓	0,2	5,0	0,0		am mattesten		"		
					Nach 34 Minuten		Nach 75 Minuten	Nach 180 Minuten	
	4,0	1,0	12,0	+ je 2,0 ccm einer 3,5 proz. Lösung von benzoesaurem Natron	munter		munter	munter	
	1,0	4,0	12,0		träges Reaktionsschwimmen		fast reaktionslos	reaktionslos	
↓	0,2	5,0	12,0		fast reaktionslos		reaktionslos	"	
	0,1 mol.	0,1 mol.			Nach 4 Minuten		Nach 8 Minuten		
	8,8	1,1	9,0	+ je 2,0 ccm einer 0,67 proz. Kapronsäurelösung	munter		munter		
	4,4	5,7	9,0		"		matt		
↓	1,0	9,0	9,0		sehr matt		reaktionslos		
					Nach 20 Minuten		Nach 2 Stunden	Nach 4 Stunden	
	8,8	1,1	9,5	+ je 0,5 ccm einer 1 proz. Lösung von kapronsaurem Natron	vorzügl. Schwimmen	munter	Zusatz von je 1,0 ccm einer 1,2 proz. Lösung von kapronsaurem Natron	munter	
	4,5	5,5	9,5		"	"		matt	
	3,4	6,4	9,5		"	"		äußerst matt	
↓	0,5	9,0	9,5		nur noch Zuckungen		reaktionslos	reaktionslos	
					Nach 10 Minuten		Nach 15 Minuten	Nach 60 Minuten	Nach 90 Minuten
	8,8	1,1	6,0	+ je 4,0 ccm einer 4 proz. Lösung von salicylsaurem Natron	munter		munter	munter	munter
	4,5	5,5	6,0		"		"	reaktionslos	reaktionslos
	3,4	6,4	6,0		"		"	"	"
↓	0,5	9,0	6,0		50% reaktionslos		reaktionslos	"	"

Tabelle IV.

Verhalten von Kaulquappen in Lösungen von Nichtelektrolyten, deren Wirkungsintensität und Geschwindigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration unabhängig ist.

Natriumphosphatlösung: …nd. …nol. …m	Natriumphosphatlösung: primär 0,1 mol. ccm	Destilliertes Wasser ccm		Verhalten der Kaulquappen	
				Nach 8 Minuten	Nach 15 Minuten
,8	1,1	0,0	+ je 4,4 ccm einer 2,5% Lösung von Aethylurethan	überall gleich träge	überall nur noch gleich geringe Spuren v. Reaktion u. überall gleich schnelle Erholbarkeit im frischem Wasser
,0	6.0	0,0			
,1	9,8	0,0			
				Nach 3 Minuten	Nach 5 Minuten
,8	1,1	13,0	+ je 4,0 ccm einer 0,5% Lösung von Acetanilid	überall gleich matt	überall völlig reaktionslos
,25	6,75	13,0			
,1	8,8	13,0			
				Nach 7 Minuten	Nach 16 Minuten
,8	1,1	13,0	+ je 2,7 ccm einer 0,5% Lösung von Acetanilid	überall gleich matt	überall reaktionslos
,25	6,75	13,0			
,1	8,8	13,0			

Zusammenfassung.

Die von *J. Traube* und *Overton* an verschiedenen Alkaloiden beobachtete Erscheinung, daß Zusatz von Natriumcarbonat zu der Alkaloidsalzlösung die Schnelligkeit und Intensität der Giftwirkung steigert, ist von beiden Forschern in ähnlicher Weise mit der hiermit zusammenhängenden gesteigerten Bildung der Alkaloidbase in Beziehung gesetzt worden; dabei sucht *Overton* die Wirksamkeit der Alkaloidbase gegenüber dem Alkaloid-Kation durch ihre Lipoidlöslichkeit, *Traube* dagegen durch ihre Oberflächenaktivität zu erklären. Läßt man in einer Reihe von Lösungen, deren Aciditäts- bzw. Alkalinitätsgrad durch Gemische von sekundärem und primärem Natriumphosphat oder von Natriumacetat und Essigsäure abgestuft ist, Gifte auf Kaulquappen, Bakterien, Paramäcien einwirken, so zeigt sich die Abhängigkeit der Alkaloidwirkung von der $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration besonders übersichtlich. Innerhalb aller mit Natriumphosphatgemischen erreichbaren Aciditäts- und Alkalinitätsgrade war eine Steigerung des Alkalinitätsgrades mit einer Steigerung der Alkaloidwirkung verbunden.

Umgekehrte Verhältnisse zeigen sich bei Salzen, bei denen im Gegensatz zu den Alkaloidsalzen für die Giftwirkung gerade die Säurereste entscheidend sind, die wie z. B. beim buttersauren und benzoesauren Natron in je höherem Maße in die lipoidlösliche bzw. oberflächenaktive

undissoziierte Säure umgewandelt werden, je saurer die Reaktion der Lösung ist. Solche Substanzen wirken desto schneller und intensiver giftig, je höher der Aciditätsgrad ist.

Verwende ich aber wiederum pharmakologisch wirksame Körper, deren Lipoidlöslichkeit und Oberflächenaktivität unabhängig von der Wasserstoffionenkonzentration ist, wie Acetanilid und Äthylurethan, so findet man bei verschiedenen Aciditäts- bzw. Alkalinitätsgraden eine gleich schnelle und gleich intensive Wirkung.

Bei den Versuchen mit Staphylokokken, bei denen zur Abstufung des Aciditätsgrades Gemische von Natriumacetat und Essigsäure verwendet wurden, zeigten sich die gleichen Verhältnisse wie bei den Kaulquappen. (Mit Natriumcarbonat haben bereits *Morgenroth* und *Bumke*, Dtsch. med. Wochenschr. 1918, Nr. 27, S. 729; *Morgenroth* und *Tugendreich*, diese Zeitschr. **79**, 257. 1917 die Steigerung der desinfizierenden Wirkung von Chinaalkaloiden gezeigt.)

Bei den Kaulquappen ist die Abhängigkeit der Wirkung dieser Gruppen von Giften von der Wasserstoffionenkonzentration als Permeabilitätserscheinung zu deuten, indem die untersuchten Stoffe in ihrer lipoidlöslichen bzw. oberflächenaktiven, undissoziierten Form schneller in die Blutbahn gelangen als in Form lipoidunlöslicher, oberflächenaktiver Ionen. Bei Stoffen, die in keiner lipoidlöslichen bzw. oberflächenaktiven Form vorkommen können, wie Kalium- und Natriumchlorat, arseniksaure Salze und andere Gifte ließen sich bei dieser Versuchsanordnung ähnlich übersichtliche Gesetzmäßigkeiten nicht finden, und es traten im Gegensatz zu obigen Stoffen hierbei besonders häufig außerordentliche Verschiedenheiten in der Empfindlichkeit der einzelnen Exemplare zur Geltung.

Studien über die Bildung der bakteriellen Toxine.

II. Diphtherietoxin.

Von

L. E. Walbum.

(Aus dem Statens Seruminstitut, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 22. Februar 1922.)

Mit 12 Abbildungen im Text.

Inhaltsverzeichnis.

Für die klassischen Toxinuntersuchungen, die im Anfange dieses Jahrhunderts ausgeführt wurden, kam in weit überwiegendem Grad das Diphtherietoxin zur Verwendung, aber trotzdem eben dieses Toxin eingehend untersucht worden ist, sind die an seine Darstellung geknüpften, besonders anfangs bedeutenden Schwierigkeiten bei weitem noch nicht überwunden. Früher hat man die Ursachen einer versagenden Toxinbildung in dem verwendeten Bacillenstamme gesucht, aus welchem Grunde ein lebhafter Austausch toxigener Stämme unter den verschiedenen Laboratorien der Welt stattfand.

Im Jahre 1894 wurde von Dr. *Anna W. Williams* in Nev York Health-Department ein Stamm isoliert — Park Williams Bacil Nr. 8 —, welcher sich in besonderem Grade für Toxindarstellung geeignet erwies; dieser Stamm hat seitdem und anscheinend ungeschwächt seine toxinogenen

Eigenschaften beibehalten und wird noch heutzutage wohl fast über die ganze Welt zur Produktion von Diphtherietoxin verwendet. Daß derselbe Stamm so lange Zeit hindurch verwendbar geblieben ist, läßt nicht auf eine stark ausgesprochene Variation der toxinogenen Eigenschaften des Diphtheriebacillus schließen. Die Versuche von *Lewis Davis*[1]) deuten jedoch die Möglichkeit derartiger Änderungen an; er sammelte 6 verschiedene Kulturen des „Bacillus Nr. 8" aus 6 verschiedenen Laboratorien ein und stellte mit ihnen auf völlig gleiche Weise Toxin dar. Aus den L_+-Werten dieser 6 Toxine war der eine $< 0{,}25$ ccm, ein anderer $= 0{,}33$ ccm, zwei $= 0{,}50$ ccm und die beiden übrigen $> 0{,}50$ ccm; diese Unterschiede, welche jetzt nicht als besonders groß erscheinen, können möglicherweise anderen Faktoren als eben der Variabilität der Stämme zugeschrieben werden. Es sei übrigens bemerkt, daß der L_+-Wert kein eigentliches Maß für die gebildete Toxinmenge gibt, und da der Verfasser die D. m. l. der verschiedenen Toxine nicht gemessen hat, ist der Wert des Versuches nicht groß.

Daß die Zusammensetzung des Nährbodens für die Toxinbildung von allergrößter Bedeutung ist, kann nicht bezweifelt werden, und die im Laufe der Zeit erschienenen zahlreichen Vorschläge zur Darstellung von Nährböden zeigen, daß dies tatsächlich sehr früh die herrschende Anschauung gewesen ist. Daß ferner die Reaktion der Flüssigkeit, die Bruttemperatur und Züchtungszeit eine sehr große Rolle für den Verlauf der Toxinbildung spielt, gehört auch zu den frühzeitig gemachten Beobachtungen, aber aller Regulation dieser Faktoren zum Trotz gelang es jedoch keineswegs die Toxindarstellung in nur einigermaßen sichere Bahnen zu leiten.

Es finden sich in der Literatur Angaben (*Ushinsky*, *Hadley* u. a. m.), denen zufolge die Diphtheriebacillen in Nährböden bekannter chemischer Zusammensetzung nicht nur wachsen, sondern zugleich Toxin bilden können, diese Angaben konnten aber gegenüber der wissenschaftlichen Kritik nicht bestehen. Soll ein üppiges Wachstum von Diphtheriebacillen erhalten werden, ist man auf das Arbeiten mit Nährböden von zum Teil unbekannter Zusammensetzung, wie Absude von Fleisch, Hefe u. dgl. angewiesen.

Alle Versuche zur Darstellung besserer Nährböden liefen darauf hinaus, daß es unmöglich war, einen geeigneteren als den am frühesten benutzten zu finden, nämlich die gewöhnliche Fleischbrühe mit Pepton und Salz.

Im Untenstehenden habe ich eine Reihe systematischer Untersuchungen über den Einfluß der 3 Faktoren: Wasserstoffionenkonzentration, Temperatur und Zeit auf das Wachstum und die Toxinbildung der Diphtheriebacillen unternommen und ferner betreffs der Bedeutung dieser Faktoren für die Erhaltung des in den Kulturen gebildeten

Toxins. Es finden sich schließlich Versuche über die Abhängigkeit der Toxinbildung von der Zusammensetzung des Nährbodens und über die Bedeutung der Sterilisation im Autoklaven.

Während der Ausführung dieser Arbeit, deren Anfang mehr als 5 Jahre zurückliegt, sind einige Arbeiten erschienen, welche diese Verhältnisse mehr oder weniger tangieren. Besonders die Wasserstoffionenkonzentration ist der Gegenstand jener Untersuchungen gewesen. Die Ergebnisse der Mehrzahl dieser Arbeiten scheinen indessen in den Hauptzügen mit den meinigen in Einklang zu stehen.

Für sämtliche untenstehende Versuche wurde ausschließlich der erwähnte amerikanische Bacillenstamm verwendet.

Betreffs der elektrometrischen und colorimetrischen Messung der Wasserstoffionenkonzentration in Nährböden, Kulturen und Kulturfiltraten verweise ich auf meine früher publizierte Arbeit über das Staphylolysin*).

A. Die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration, der Temperatur und der Zeit für das Wachstum der Diphtheriebacillen.

Die etwas älteren Aufschlüsse in der Literatur betreffs der Bedeutung der Reaktion, Temperatur und Zeit berücksichtigen fast alle nur die Toxinbildung und nicht die Wachstumsverhältnisse der Diphtheriebacillen, besonders nicht an den Grenzen, die von den erwähnten Faktoren dem Wachstum gesetzt sind.

Als erster machte *Spronck*[2]) darauf aufmerksam, daß Diphtheriekulturen auf verschiedene Weise und von der Reaktion abhängig sich entwickeln können, Ergebnisse, die durch Untersuchungen von *Madsen*[3]) bestätigt wurden. Außer den in diesen Arbeiten erwähnten interessanten, während des Wachstums in den Kulturen eintretenden Reaktionsänderungen, auf welche ich später zurückkommen werde, finden sich hier zugleich Beschreibungen des Wachstums bei den verschiedenen Aciditätsgraden. Es geht daraus hervor, daß das Wachstum der Diphtheriebacillen in saurem Nährboden spärlich ist, und die Bouillon nur diffus trübe macht, während das Wachstum in alkalischen Medien üppiger wird, was durch Bildung von einem Bacillenhäutchen auf der Oberfläche der Flüssigkeit gekennzeichnet ist; daß die Bildung dieses Häutchens ebenso wie dessen Dicke von dem Alkalescenzgrade abhängig ist und mit ansteigender Alkalescenz zunimmt, wurde von *Madsen* gezeigt, indem er durch Züchtung in einer Reihe Bouillons von verschiedenem Alkalescenzgrad eine ganze Skala von Häutchen erhielt, deren Dicke mit der Alkalescenz zunahm. Seitdem man die Acidität der Flüssigkeiten genau zu messen gelernt hat, ist eine nicht geringe Anzahl von Arbeiten erschienen, welche unter dem Gesichtspunkt in

*) Diese Zeitschr. **129**, 367. 1922.

Angriff genommen worden sind, die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Wachstumsverhältnisse der verschiedenen Mikroben zu ermitteln, und zwar nicht nur betreffs der optimalen Reaktion, sondern auch bezüglich der Wachstumsgrenzen; Untersuchungen über Diphtheriebacillen sind indessen nur spärlich erschienen. *Fr. v. Gröer* und *Joh. Srnka*[4]) geben das Wasserstoffionenkonzentrations-Optimum für Wachstum auf $p_{H^{\cdot}} = 7{,}8$ an. *Bunker*[5]) hat sich in die Frage etwas mehr vertieft und setzt $p_{H^{\cdot}} = 7{,}0$—$7{,}5$ als Optimum für das Wachstum der Diphtheriebacillen an und $p_{H^{\cdot}} = 7{,}3$—$7{,}5$ als die für Häutchenbildung günstigste Anfangskonzentration. Übrigens stellt sich Häutchenbildung zwischen $p_{H^{\cdot}} = 5{,}6$ und 8,8 ein, aber auch außerhalb dieser Grenzen können die Bacillen wachsen, aber nur, wenn das Wachstum innerhalb der erwähnten Grenzen der Wasserstoffionenkonzentration eingeleitet worden ist. Jüngst hat *K. G. Dernby*[6]) diese Verhältnisse untersucht und die Wachstumsgrenzen $p_{H^{\cdot}} = 6{,}0$—$8{,}3$ und die Optimalzone $= p_{H^{\cdot}}$ *7,3—7,6* gefunden.

Für meine Untersuchungen über die Abhängigkeit des Wachstums von den 3 obenerwähnten Faktoren habe ich völlig dieselbe Technik wie bei den entsprechenden Versuchen mit Staphylokokken befolgt*). Die Versuche sind bei den untenstehenden Temperaturen ausgeführt worden:

22°, 24°, 26°, 28°, 30°, 32°, 34°, 36°, 38° und 40°;

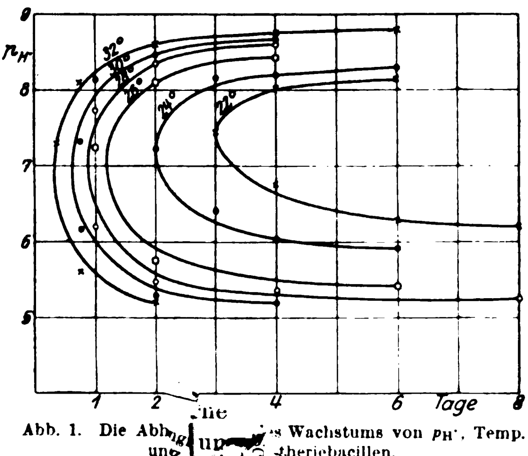


Abb. 1. Die Abh[illegible] ...s Wachstums von $p_{H^{\cdot}}$, Temp. und Ze[illegible] ...theriebacillen.

bei 20° und 42° stellte sich innerhalb 25 Tagen kein Wachstum mehr ein.

Die Resultate dieser Untersuchungen sind in Abb. 1 (von 22°—32°) und Abb. 2 (von 34°—40°) verzeichnet.

Ebenso wie bei den Staphylokokkenversuchen bezeichnen die an den Abbildungen angegebenen Punkte die Zeitpunkte, an welchen bei den betreffenden Wasserstoffionenkonzentrationen Wachstum am frühesten beobachtet worden ist. Es überschritt während der Versuchsdauer nicht die an den Endpunkten der Kurven angegebenen Wasserstoffionenkonzentrationen.

Der Einfluß dieser 3 Faktoren auf das Wachstum der Diphtheriebacillen ist natürlich prinzipiell derselbe wie auf das der Staphylokokken

*) Diese Zeitschr. **129**, 367. 1922.

und wohl übrigens auf das Wachstum aller Mikroben; nur sieht man, daß das Gebiet der Wasserstoffionenkonzentration, in welchem die Diphtheriebacillen zu wachsen vermögen, bedeutend enger ist als das entsprechende der Staphylokokken; diese letzteren können sich nämlich zwischen $p_{H^{\cdot}}$ = etwa 4,5 und $p_{H^{\cdot}}$ = etwa 9,8 entwickeln, während die Diphtheriebacillen nur zwischen $p_{H^{\cdot}}$ = etwa 5,2 und $p_{H^{\cdot}}$ = etwa 8,90 wachsen.

Die $p_{H^{\cdot}}$-Grenzen für Wachstum bei den verschiedenen Temperaturen sind in der Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I.

Temp.	$p_{H^{\cdot}}$-Grenzen f. Wachstum	
	sauer	alkalisch
22°	6,20	8,17
24°	5,92	8,30
26°	5,40	8,42
28°	5,20	8,60
30°	5,20	8,82
32°	5,20	8,82
34°	5,20	8,90
36°	5,20	8,60
38°	5,60	8,22
40°	5,90	7,90

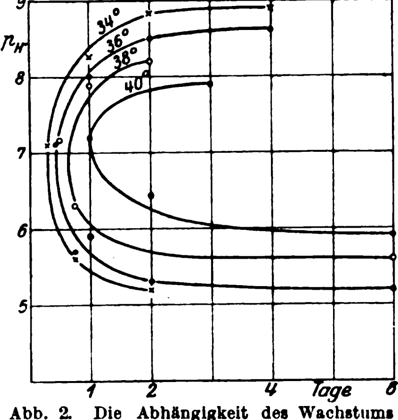


Abb. 2. Die Abhängigkeit des Wachstums von $p_{H^{\cdot}}$, Temp. und Zeit. Diphtheriebacillen.

Aus den Zahlen der Tabelle I und aus den Abbildungen 1 und 2 geht hervor, *daß die günstigste Temperatur für das Wachstum der Diphtheriebacillen um 34° liegt, während die optimale Wasserstoffionenkonzentration sehr nahe bei* $p_{H^{\cdot}}$ = *7,0, d. h. um den Neutralpunkt herum liegt; man bemerkt jedoch eine geringe Verschiebung dieses Optimums gegen die alkalische Seite hin, wenn die Temperatur ungünstig wird.* (*Siehe die Versuche bei 40°, 22° und 24°.*)

Diese Resultate, die durch einen zweiten entsprechenden Versuch gestützt werden, fallen einigermaßen mit *Bunkers* zusammen (Optimum $p_{H^{\cdot}}$ 7,0—7,5), dagegen liegen sie ziemlich weit von dem von *v. Gröer* und *Srnka* gefundenen Optimum ($p_{H^{\cdot}}$ = 7,8); diese Untersuchungen sind vielleicht mit der von den Verfassern in Vorschlag gebrachten Placentabouillon ausgeführt worden, bei welcher die Verhältnisse vielleicht etwas anders liegen mögen.

Wie erwähnt, ist das Wachstum der Diphtheriebacillen in saurem und in alkalischem Nährboden von einem höchst verschiedenen Aussehen, das besonders durch das Vorhandensein oder Fehlen der für Diphtheriekulturen so typischen Häutchenbildung in die Augen fällt. In den oben mitgeteilten Versuchen habe ich die Zeitpunkte der Ent-

wicklung dieser Häutchen genau notiert; für die Optimaltemperatur 34° habe ich in Abb. 3 diese Beobachtungen eingetragen.

Die Kurve gibt die Grenzen der Wasserstoffionenkonzentration für das Wachstum der Diphtheriebacillen bei 34° an, und die gezeichneten Punkte das Erscheinen und die Entwicklung der Häutchen; ein Punkt bezeichnet eine schwache, 2 Punkte eine ziemlich starke und 3 eine sehr starke Häutchenbildung.

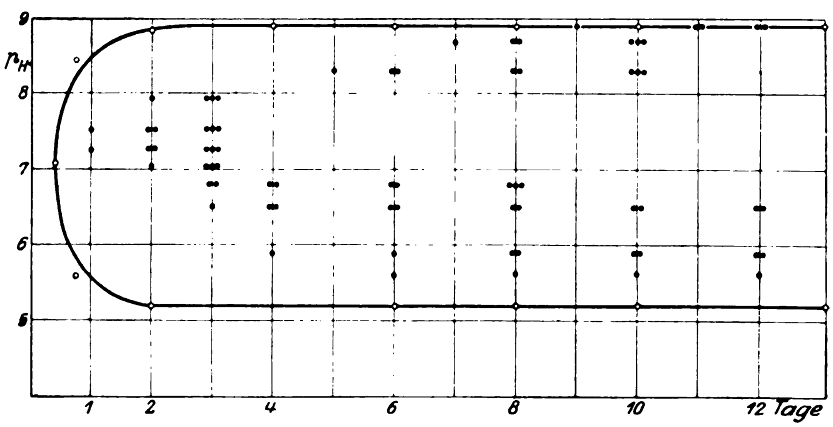


Abb. 3. Abhängigkeit des Wachstums von p_{H}· und Zeit. Hautbildung. Temp. = 34°.
• schwache Haut. •• ziemlich starke Haut. ••• sehr starke Haut.

Es geht aus diesem und mehreren anderen übereinstimmenden Versuchen hervor, daß die Häutchenbildung schon nach 24 Stunden in den Bouillons anfängt, welche *eine Anfangswasserstoffionenkonzentration von* $p_{H^{\cdot}}$ *= etwa 7,5 haben, weshalb diese als Optimum für die Häutchenbildung betrachtet werden darf.* Bei Wasserstoffionenkonzentrationen, die beiderseits des $p_{H^{\cdot}}$ 7,5 liegen, fängt die Häutchenbildung später an, bei $p_{H^{\cdot}}$ = 7,0 und 8,0 erst nach etwa 2 Tagen, bei $p_{H^{\cdot}}$ = 6,5 nach etwa 3 Tagen, bei $p_{H^{\cdot}}$ = 8,3 erst nach etwa 5 usw. *Bei dieser optimalen Reaktion erreichen die Häutchen schnell (3 Tage) ihre volle Größe.* Es scheint jedoch kein wesentlicher Unterschied zwischen $p_{H^{\cdot}}$ = 7 und 8 zu bestehen; in den Kulturen mit größerer Alkalinität erreichen die Häutchen erst später (etwa 10 Tage) ihre volle Größe, und ebenfalls in Kulturen mit einem Anfangswert von $p_{H^{\cdot}} < 7$; *in Kulturen mit einer geringeren* $p_{H^{\cdot}}$ *als etwa 6,8 erreichen die Häutchen nicht die volle Größe und werden mit zunehmender Acidität allmählich dünner.*

Es geht ferner aus der Abb. 3 hervor, *daß die Häutchenbildung in den alkalischen Kulturen bis an die Wachstumsgrenze sich einstellt, während sie in den sauren schon vor dem Erreichen der Wachstumsgrenze ausbleibt,* und zwar bei $p_{H^{\cdot}}$ = 5,6. Da ich gegen die alkalische Seite hin für die Häutchenbildung (aber gewiß auch für Wachstum) eine $p_{H^{\cdot}}$-Grenze

bei ca. 8,9 fand, fallen meine Resultate in diesen Punkten mit *Bunkers* völlig zusammen. Seine Angabe, daß die Diphtheriebacillen auch außerhalb dieser Grenzen wachsen können, wenn das Wachstum bei einem innerhalb der Grenzen für Häutchenbildung liegenden $p_{H^{\cdot}}$ eingeleitet worden ist, kann ich indessen betreffs des Wachstums gegen die alkalische Seite hin nicht völlig bestätigen. Gegen die saure Seite hin können nach meinen Versuchen (siehe Abb. 3) die Diphtheriebacillen bei einem niedrigeren $p_{H^{\cdot}}$ als 5,6 wachsen, *nämlich bei 5,20, und zwar ohne vorher in einer weniger sauren Flüssigkeit gewachsen zu sein.*

Ebenso wie der Wachstumsbereich ist auch das Gebiet für Häutchenbildung — sogar in noch etwas höherem Grade — von der Temperatur abhängig. *Während die Einleitung des Wachstums bei 34° am schnellsten vor sich geht, scheint ca. 36° das Temperaturoptimum für Häutchenbildung zu sein.* Je mehr die Temperatur von diesem Optimum abweicht, um so schwächer wird die Häutchenbildung. Diese Abnahme geht gegen die höheren Temperaturen hin schneller vor sich als gegen die niedrigeren. Bei 40° wachsen die Diphtheriebacillen zwischen $p_{H^{\cdot}}$ ca. 7,90 und ca. 5,90, und bei $p_{H^{\cdot}}$ = ca. 7,2 ist schon nach 24 Stunden Wachstum vorhanden, aber die Häutchenbildung, die außerdem sehr unvollständig wird, stellt sich erst nach ca. 8 Tagen ein, und zwar nur in den Kulturen, deren Anfangs-$p_{H^{\cdot}}$ bei 7,50 liegt. Bei 22° wachsen die Bacillen von $p_{H^{\cdot}}$ ca. 8,17—6,20, aber die Häutchenbildung findet erst und äußerst spärlich nach etwa 10 Tagen statt.

B. Die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration, der Temperatur und der Zeit für die Bildung des Diphtherietoxins.

Daß diese 3 Faktoren einen sehr beträchtlichen Einfluß auf die Bildung des Diphtherietoxins ausüben, wurde schon in den ersten Jahren der Toxinforschung beobachtet; die Aufmerksamkeit wurde dann hauptsächlich dem Alkalescenzgrad der Bouillon und der Züchtungszeit gewidmet, denn die Züchtung wurde immer bei einer Temperatur von 36—37° vorgenommen, die a priori als die günstigste angesehen wurde. Etwas später wurde vorgeschlagen die Diphtheriebacillen bei einer etwas niedrigeren Temperatur (33—35°) zu züchten, um das gebildete Toxin möglichst wenig abzuschwächen (*Madsen*).

Die Untersuchungen über die Bedeutung der Acidität der Bouillon leiden alle an dem Mangel, daß man damals nicht imstande war, den Aciditätsgrad genau anzugeben; man mußte sich mit Titrationszahlen begnügen, d. h. mit der Feststellung, wieviel Kubikzentimeter Normallauge oder Normalsäure zur Neutralisation gegenüber den verschiedenen Indikatoren (besonders Lackmus und Phenolphthalein) erforderlich waren; oft wurde der Nährboden gegenüber Lackmus neutralisiert, wonach eine gewisse Anzahl Kubikzentimeter Normalnatron oder

Normalsoda zugetan wurde, oder der Nährboden wurde mit Phenolphthalein als Indikator neutralisiert und der passende Alkalescenzgrad durch Hinzufügen von Normalsäure bewerkstelligt. Jetzt weiß man indessen, daß aus derartigen Titrationszahlen so gut wie nichts betreffs des wahren Aciditätsgrades, d. h. der Wasserstoffionenkonzentration der Flüssigkeit geschlossen werden kann, denn diese ist bekanntlich auch von vielen anderen Verhältnissen als den hinzugefügten Säuren oder Basenmengen abhängig. Diese Verhältnisse machten es unmöglich, mit Sicherheit an verschiedenen Zeitpunkten Nährböden von demselben Aciditätsgrade darzustellen. Unser gegenwärtiges Wissen von der Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Wachstumsverhältnisse und das Giftbildungsvermögen der Mikroben läßt erkennen, daß in diesem mangelhaften Verfahren jedenfalls eine der Ursachen der früher beobachteten starken Variationen der Giftbildung gelegen ist.

Obwohl aber diese älteren Untersuchungen uns kaum über die absoluten Werte der Wasserstoffionenkonzentration Aufschlüsse geben können, muß diesen Arbeiten dennoch ein beträchtlicher Wert beigemessen werden; denn sie sagen uns, daß für die Toxinbildung ein Alkalescenzoptimum vorhanden ist, welches zwischen den Umschlagspunkten von Lackmus und Phenolphthalein (d. h. zwischen $p_{H^{\cdot}}$ ca. 7,0 und 8,3) liegt; ferner geben uns diese Versuche gute Aufschlüsse über die Schwankungen in der Reaktion der Kultur, die während des Wachstums vor sich gehen, was u. a. die Beobachtung von verschiedenen Wachstumstypen veranlaßt hat, die eine Entwicklung der Kultur in verschiedene Richtungen hin veranlassen können, sowohl betreffs Wachstum, Reaktionsänderung und Toxinbildung.

Sämtliche nachfolgende Versuche über die Diphtherietoxinbildung sind in ähnlicher Weise wie bei der Toxindarstellung im großen, d. h. mit großen Substratquantitäten (in der Regel 40—60 Liter) und mit 700 ccm in jedem (1,5 Liter fassenden) Erlenmeyerkolben unternommen worden; die Erfahrung hat nämlich gelehrt, daß die Entwicklung in kleinen Flaschen oder Reagensgläsern andersartig und in der Regel schneller als in größeren Flüssigkeitsmengen, die in größeren Kolben enthalten sind, verläuft. Ich habe diese Technik auch deshalb beibehalten, weil die dadurch gemachten Erfahrungen sich dann ohne weitere Untersuchungen direkt auf die praktische Toxindarstellung überführen ließen. Da man ebenfalls weiß, daß Entwicklung und Toxinbildung in den verschiedenen Kolben trotz völlig gleicher Behandlung nicht immer gleichartig verlaufen, habe ich bei der Probeentnahme mich nicht mit einem einzelnen Kolben begnügt, sondern immer wenigstens 4 entnommen (im ganzen somit 2800 ccm), deren Inhalt nach Mischen und Filtrieren untersucht wurde. Es ließ sich bei einer derartigen Versuchsanordnung vermuten, daß ein großer Teil der

Fehlerquellen eliminiert werden würde, und der verhältnismäßig stetige Verlauf meiner Kurven zeigt auch, daß dies großenteils der Fall war.

Für sämtliche Untersuchungen wurde, falls nichts anderes angeführt wird, der untenstehende Nährboden verwendet, welcher nach meinen mehrjährigen Erfahrungen für die Toxinbildung am besten ist.

20—30 kg gehacktes, von Fett und Sehnen möglichst befreites Kalbfleisch wird in einem emaillierten Topf mit 10—15 l warmem Leitungswasser gemischt, so daß die Temperatur der Mischung 26° wird, worauf unter kräftigem Umrühren etwa 100 ccm 24stündiger Colikultur in gewöhnlicher Bouillon zugesetzt wird. Der Topf wird zugedeckt und an einen Ort hingestellt, wo die Temperatur nachtsüber nicht unter 20° sinkt. Die Mischung steht bis nächsten Morgen, d. h. 18—20 Stunden; es ist nicht zweckmäßig, diese Coligärung bei einer höheren Temperatur, z. B. 37°, vor sich gehen lassen, weil die durch das Wachstum der Colibacillen verursachten Umbildungen dadurch zu eingreifend werden, was sich oft in einer weniger starken Toxinbildung zu erkennen gibt. Die in Gärung befindliche Fleischmasse wird durchgerührt und einige Minuten in einem Dampftopf gekocht, die Flüssigkeit in einer Handpresse abgepreßt und die Preßkuchen mit einer passenden Menge Wasser nochmals ausgekocht; nach wiederholtem Pressen muß das Volumen der Flüssigkeit so groß sein, daß jedem Kilo Fleisch 2 Liter Bouillon entsprechen; falls weniger vorhanden ist, wird das Volumen durch Wasserzusatz korrigiert. In dieser warmen Bouillon werden 0,2% Invertzucker (oder Traubenzucker), 0,5% Chlornatrium und 1,5% Pepton Witte gelöst. Nach einige Minuten langem Kochen wird die Flüssigkeit filtriert und auf 1,5 l fassende Erlenmeyerkolben verteilt, so daß auf jeden Kolben genau 700 ccm kommen; die Kolben werden mit unentfetteter Watte verschlossen und mit einer doppelten Papierschicht überbunden. Die Sterilisation wird bei einer Temperatur von 115° in 15 Minuten in einem großen Autoklaven vorgenommen, in dem *sämtliche Kolben auf einmal Platz finden können.* Der Autoklav wird erst nach teilweiser Abkühlung geöffnet, d. h. einige Stunden nachdem der Druck herabgesunken ist.

Die Alkalisierung der Bouillon geht folgendermaßen vor sich: In einer kleinen Probe (10 ccm) der sterilisierten und abgekühlten Bouillon wird festgestellt, wieviel Soda zugetan werden muß, um eine Wasserstoffionenkonzentration von der erwünschten Größe zu erhalten. Diese colorimetrische Messung wird in einem mit Glaswänden versehenen Wasserbad bei 36—37° in gewöhnlicher Weise vorgenommen, indem man zur Bouillon soviel einer 10proz. Lösung von calcinierter Soda gibt, daß die Farbe der Flüssigkeit (Indikator: z. B. Phenolrot) dieselbe Nuance wie die Vergleichsflüssigkeit erhält. Die berechnete Menge calcinierte Soda (für 700 ccm Bouillon) wird in Reagenzgläsern abgewogen, welche mit Wattestöpsel versehen durch 2stündiges Erhitzen auf 165° sterilisiert worden sind. Zu jedem Kolben der sterilen Bouillon wird der Inhalt eines Reagenzglases getan und der Nährboden nach Auflösen der Soda geimpft.

Dieses Vorgehen weicht von dem gewöhnlichen besonders dadurch ab, daß die Alkalisierung *nach* der Sterilisation ausgeführt wird; hierdurch wird erzielt 1. daß die Bouillon durch das Erwärmen, welches bei $p_{H^{\cdot}}$ ca. 6,2 anstatt bei $p_{H^{\cdot}} =$ ca. 7,8—8,0 vor sich geht, weniger verändert

wird und 2. daß die Bouillon beim Impfen tatsächlich die erwünschte Wasserstoffionenkonzentration hat. Beides scheint von nicht geringer Bedeutung für die Erzielung eines guten Resultates zu sein.

a) Änderungen des p_{H} während des Wachstums.

Roux und *Yersin*[7]) haben zuerst gezeigt, daß während des Wachstums der Diphtheriebacillen in der Bouillon beträchtliche Reaktionsänderungen stattfinden. Die Frage wurde später von *Escherich*[8]) und *Fibiger*[9]) genauer untersucht, und beide Verfasser fanden, daß die Bouillonkulturen erst sauer, danach wieder alkalisch wurden. Dieser Umschlag trat aber erst sehr spät ein (7—10 Wochen nach dem Impfen). Die Kulturen *Nicolles*[10]) wurden dagegen konstant schon 7 Tage nach dem Impfen alkalisch.

Im Jahre 1895 wurde von *Spronck*[2]) gezeigt, daß eine Diphtheriekultur in Bouillon sich verschiedenartig entwickeln kann; er stellte folgende Typen auf:

Type A. Die Reaktion wird allmählich sauer, die Bacillen sterben und das Filtrat enthält kein Toxin.

Type B. Die Reaktion wird nicht sauer, sondern allmählich alkalischer. Starke Toxinbildung.

Type C. Die Reaktion wird schnell sauer, schlägt aber allmählich in alkalische Reaktion um, die Alkalinität nimmt zu und eine gute Toxinbildung findet statt.

Spronck war der Ansicht, daß die Ursache der Säurebildung im Gehalt des Fleisches an Muskelzucker zu suchen wäre; durch Aufbewahren des Fleisches vor der Zubereitung der Bouillon wurden die Kulturen gar nicht sauer, die Alkalinität nahm aber vom Anfange an zu und es wurden große Toxinmengen gebildet.

Madsen[3]) hat diese Verhältnisse in der Weise eingehend studiert, daß er in vielen Kulturen die Reaktionsänderungen 30 Tage verfolgte. Auf Grund seiner Versuche stellt er 2 Typen auf: Kulturen, welche sauer, und solche, die alkalisch werden, die also den Typen A und C *Sproncks* entsprechen. Kulturen vom Typus B wurden nicht von *Madsen* beobachtet, da die Säurebildungsperiode niemals ausblieb, obwohl sie oft sehr kurz war und nur einen Tag dauerte.

Einer der wenigen, die in zeitgemäßer Weise die Änderungen der Wasserstoffionenkonzentration während des Wachstums der Diphtheriebacillen gemessen haben, ist *W. M. Bunker*[5]). Die Untersuchungen sind nicht besonders ausgedehnt, die Änderungen sind nur 8 Tage hindurch verfolgt worden. Das Anfangs-p_{H} war 7,0—7,1, nach 4 Tagen 7,92, nach 5 Tagen 8,10, nach 6 Tagen 8,22 und nach 8 Tagen 8,30; die größte Toxinkonzentration wurde in 5 Tagen erreicht; ferner sind die Versuche

in kleinen Flaschen ausgeführt worden, in welchen das Wachstum und die Toxinbildung schneller als in größeren Kolben vor sich gehen, weshalb die Resultate sich nicht für die bei der praktischen Darstellungsweise übliche Technik verwerten lassen.

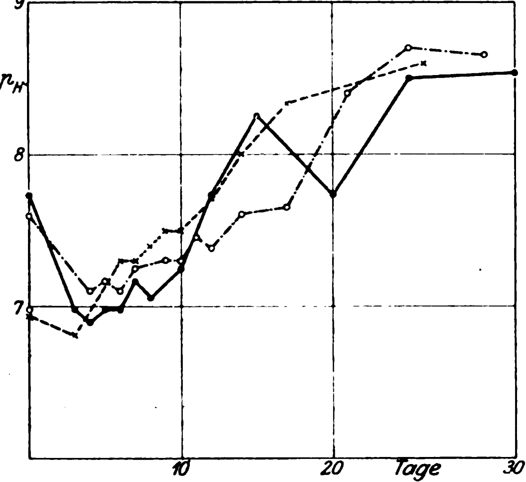


Abb. 4. Änderung von $p_{H^\cdot}$ in einer Diphtheriekultur während des Wachstums. • ⊙ Pepton Witte. × Pepton Chapoteaut.

Für meine diesbezüglichen Versuche habe ich 3 an verschiedenen Zeitpunkten (5. III., 31. III. und 17. IV. 1920) dargestellte Bouillonpräparate verwendet, welche wie auf S. 33 beschrieben zubereitet wurden.

Für den Versuch A habe ich Pepton Witte verwendet und zur Alkalisierung 0,26 proz. calc. Soda ($p_{H^\cdot} = 7{,}73$), für Versuch B ebenfalls Pepton Witte und 0,30 proz. calc. Soda ($p_{H^\cdot} = 7{,}60$) und für Versuch C Pepton Chapoteaut und 0,26 proz. calc. Soda ($p_{H^\cdot} = 6{,}95$). Zu den angeführten Zeitpunkten (siehe Tabellen II, III und IV) wurden als Probe 4 Kolben entnommen, die zusammengemischt und danach filtriert wurden. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde sofort bei 37° colorimetrisch gemessen und die tödliche Minimaldosis in gewöhnlicher Weise durch subcutane Injektion an Meerschweinchen festgestellt. Die Resultate sind in den Tabellen II, III und IV zusammengestellt und in Abb. 4 und 5 graphisch dargestellt.

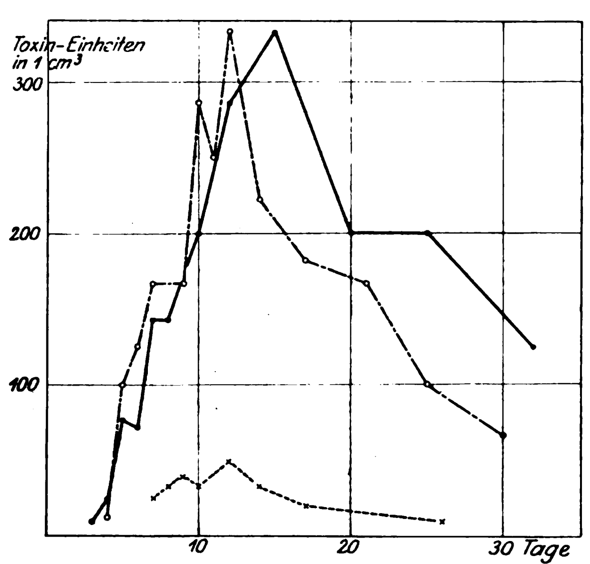


Abb. 5. Bildung des Diphtherietoxins.

Tabelle II.

Pepton Witte. p_{H}· vor dem Impfen = 7,73.

Tage im Brutschrank	p_{H}·	Wachstum	Geruch des fertigen Toxins	D. m. L.	Toxineinheiten in ccm
3	6,98	ziemlich gut	ziemlich typisch	0,1	10
4	6,90	gut	typisch	0,04	25
5	6,98	üppig	"	0,013	76,9
6	6,98	"	"	0.014	71,4
7	7,17	"	"	0,007	143
8	7,05	"	"	0,007	143
10	7,25	"	"	0,005	200
12	7,73	"	"	0,0035	286
15	8,25	"	"	0,003	333
20	7,73	"	"	0,005	200
25	8,50	"	"	0,005	200
32	8,53	"	schwach typisch	0,008	125

Tabelle III.

Pepton Witte. p_{H}· vor dem Impfen = 7,60.

Tage im Brutschrank	p_{H}·	Wachstum	Geruch des fertigen Toxins	D. m. L.	Toxineinheiten in ccm
4	7,10	üppig	schwach typisch	0,08	12,5
5	7,17	"	typisch	0,01	100
6	7,10	"	"	0,008	125
7	7,25	"	"	0,006	167
9	7,30	"	"	0,006	167
10	7,30	"	"	0,0035	286
11	7,45	"	"	0,004	250
12	7,38	"	"	0,003	333
14	7,60	"	"	0,0045	222
17	7,65	"	"	0,0055	182
21	8,40	"	"	0,006	167
25	8,70	"	"	0,01	100
30	8,65	"	"	0,015	66,7

Tabelle IV.

Pepton Chapoteaut. p_{H}· vor dem Impfen = 6,95.

Tage im Brutschrank	p_{H}·	Wachstum	Geruch des fertigen Toxins	D. m. L.	Toxineinheiten in ccm
3	6,81	gut	atypisch	>0,10	< 10
6	7,30	üppig	ziemlich typisch	0,10	10
7	7,30	"	" "	0,04	25
8	7,40	"	" "	0,03	33,3
9	7,50	"	" "	0,025	40,
10	7,50	"	" "	0,03	33,3
12	7,70	"	" "	0,02	50,
14	8,00	"	" "	0,03	33,3
17	8,34	"	" "	0,05	20
26	8,60	"	atypisch	0,10	10

Diese Versuche entsprechen in ihrem ganzen Verlauf dem Typus C *Sproncks* und dem alkalischen Typus *Madsens*. Obwohl zur Bouillon 0,2% Traubenzucker (oder Invertzucker) getan worden war, ist die Säurebildung nicht größer, als daß die Wasserstoffionenkonzentration nur bis um den Neutralpunkt vergrößert wird. An den Tabellen ist in den letzten Kolonnen der Toxininhalt in diesen Kulturen angeführt worden; die Besprechung dieser Verhältnisse findet sich unter C.

b) Abschwächung des Toxins bei verschiedenen p_H· und Temperaturen.

Das Diphtherietoxin wird gleich wie alle anderen bakteriellen Toxine mit der Zeit abgeschwächt; ob schneller oder langsamer, beruht auf verschiedenen Verhältnissen. Diese spontane Abschwächung des Diphtherietoxins ist von *Madsen* und *Arrhenius*[11]) mit dem Resultate untersucht worden, daß sie sich nach der Formel der monomolekularen Reaktion berechnen läßt. Daß sowohl Säuren wie Alkalien das Diphtherietoxin abschwächen, ist eine frühzeitig gemachte Beobachtung, und es sind ja eben diese Verhältnisse, denen die Schuld für die Zerstörung des Toxins in den Kulturen beigemessen wird, welche entweder sehr sauer oder sehr alkalisch werden. Um das Toxin in fertiggestellter filtrierter Form besser aufheben zu können, schlägt *Madsen*[12]) deshalb vor, die alkalische Reaktion durch Säurezusatz oder Dialyse etwas herabzusetzen; da indessen die Toxine auch, obwohl langsam, tierische Membranen passieren, wird ein Säurezusatz wohl vorzuziehen sein.

Da es also notwendig ist, den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration und der Temperatur auf die Zerstörung des Toxins genau zu kennen, wenn man den Verlauf der Toxinbildungskurven richtig deuten will, habe ich den untenstehenden Versuch vorgenommen.

Um gleichzeitig zu untersuchen, ob in dieser Beziehung ein Wesensunterschied zwischen einem völlig frisch dargestellten und einem etwas älteren Toxin vorhanden wäre, habe ich für die Versuche 2 Toxine gewählt: ein (Nr. V 1920) ca. 14 Tage vor dem Anfange des Versuches dargestelltes und ein anderes (Nr. XII 1919), welches ca. 1 Jahr im Kühlraum gestanden hatte.

Aus diesen beiden Toxinen wurden durch Mischen mit den angeführten Mengen Natronhydrat oder Milchsäure Serien mit verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen dargestellt; diese wurden mit Toluol überschichtet, 6 Tage im Brutschrank bei 37° hingestellt, wonach äquivalente Mengen von Milchsäure und Natronhydrat zugetan wurden, und das Volumen mit physiologischer Kochsalzlösung in sämtlichen Gläsern auf dieselbe Größe gebracht. In gewöhnlicher Weise wurde die D. m. L. jeder Mischung festgestellt, und die Proben während der Ausführung dieser Messungen in einem dunkeln Kühlraum bei ca. 2° aufgehoben.

Die Ergebnisse dieser beiden Versuchsreihen sind in Tabelle V angeführt. Gleich wie bei mehreren früher vorgenommenen Versuchen habe ich in den Tabellen die gefundenen Minimaldosen nicht angegeben, sondern die reziproken Werte dieser Zahlen, welche die Anzahl der Toxineinheiten pro Kubikzentimeter bezeichnen.

Tabelle V.

8 Toxin + ... + NaCl-Lösung bis 10 ccm	Toxin V 1920		Toxin XII 1919	
	$p_{H^{\cdot}}$ bei 37°	Toxineinheiten pro ccm	$p_{H^{\cdot}}$ bei 37°	Toxineinheiten pro ccm
0,5 $^{n}/_{1}$-NaOH	10,02	0	—	—
0,4 "	9,65	16,7	9,32	0
0,35 "	9,45	33,3	—	—
0,3 "	9,25	50	9,00	20
0,25 "	9,04	55,6	—	—
0,2 "	8,80	76,9	8,57	71,4
0,15 "	8,60	83,3	8,30	100
0,1 "	8,34	100	8,04	125
0,05 "	7,90	111	7,70	143
0,025 "	7,65	125	—	—
0 "	7,40	125	7,37	143
0,025 $^{n}/_{1}$-Milchsäure . .	7,20	125	7,22	143
0,05 " . .	7,00	118	6,95	133
0,075 " . .	6,85	111	6,70	133
0,1 " . .	6,70	111	6,60	125
0,15 " . .	6,35	100	—	—
0,2 " . .	6,05	66,7	6,10	90,9
0,25 " . .	5,80	33,3	—	—
0,3 " . .	5,55	0	5,50	0
Kontrolle im Kühlraum 8 Toxin + 2 NaCl-Lösung	7,40	167	7,37	182

Die Resultate sind in Abb. 6 graphisch dargestellt. Es geht aus diesen Untersuchungen hervor, *daß das Diphtherietoxin bei den gegebenen Versuchsbedingungen völlig vernichtet wird, wenn die Flüssigkeit saurer als* $p_{H^{\cdot}} = 5{,}5$ *und alkalischer als* $p_{H^{\cdot}} =$ *ca.* $9{,}3$*—*$10{,}0$ *ist. Die Wasserstoffionenkonzentration, bei welcher die Abschwächung des Toxins am geringsten ist, liegt nicht am Neutralpunkte, sondern zwischen* $p_{H^{\cdot}} = 7{,}2$ *und* $p_{H^{\cdot}} = 7{,}6$.

Die Abschwächung, welche das Toxin bei dieser für dessen Erhaltung optimalen Wasserstoffionenkonzentration erfährt, ist sowohl für das frischhergestellte als für das einjährige Toxin fast dieselbe, nämlich 25%.

Zugleich habe ich den Einfluß der Temperatur auf die Abschwächung des Diphtherietoxins untersucht, aber nur bei den Temperaturen, welche einige Bedeutung für die Toxinbildung selbst haben können. Ich habe 25°, 30°, 35° und 40° gewählt und die Abschwächung durch 30 Tage in 2 Toxinmischungen mit verschiedener Wasserstoffionenkonzentration,

nämlich $p_{H^{\cdot}} = 7{,}40$ (Optimum für das Aufheben) und $p_{H^{\cdot}} = 8{,}35$, beide bei 35°, gemessen.

Für den Versuch wurde Toxin Nr. VII 1920 ($p_{H^{\cdot}} = 7{,}27$ bei 35°), ca. 8 Tage vor dem Anfange des Versuches zubereitet, verwendet, und beide Mischungen wurden folgendermaßen dargestellt:

	$p_{H^{\cdot}}$ bei 18°	25°	30°	35°	40°
80 Toxin + 1,6 $^{n}/_{10}$-NaOH + 18,4 NaCl-Lösung . . .	7,55	7,48	7,44	7,40	7,34
80 „ + 12 „ + 8 „ . . .	8,57	8,48	8,41	8,35	8,28

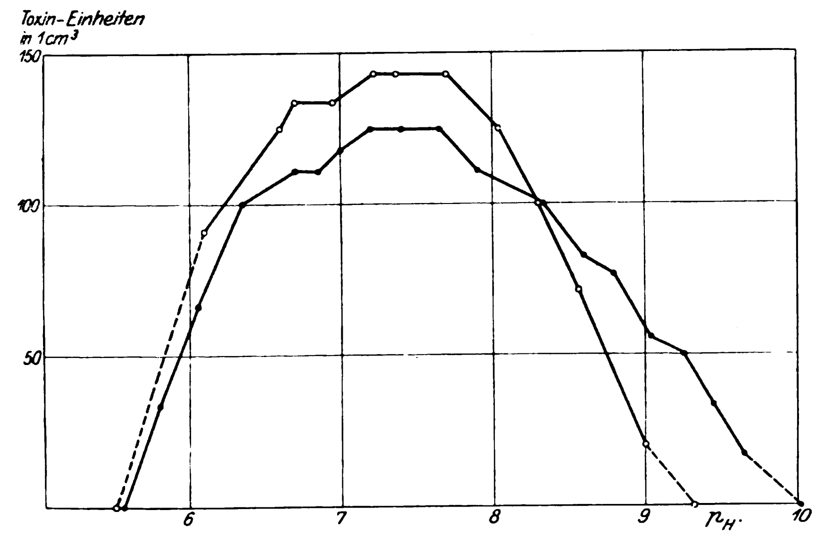


Abb. 6. Abschwächung des Diphtherietoxins bei verschiedenen $p_{H^{\cdot}}$.
⊙ Toxin XII. 1919. • Toxin V. 1920.

Die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration mit der Temperatur war in diesem Diphtherietoxin völlig dieselbe wie in Bouillon und in fertiggestelltem Staphylolysin.

Zu den angeführten Zeiten wurden Proben entnommen, zu welchen äquivalente Mengen $^{n}/_{10}$-Milchsäure + 0,9 proz. NaCl-Lösung in solchen Quantitäten getan wurden, daß das Volum mit einem Fünftel vergrößert wurde (z. B. 15 Mischung + 0,24 $^{n}/_{10}$-Milchsäure + 2,76 NaCl-Lösung); sofort nach der Entnahme wurde mit der Messung des Toxingehalts angefangen und die Proben unter diese im Kühlraum aufgehoben. Als Kontrolle wurde sofort eine Mischung von 80 Toxin + 40 NaCl-Lösung in den Kühlraum gestellt, und die Stärke dieser vor dem Anfange des Versuches und nach dessen Beendigung (30 Tage) gemessen; beide Messungen zeigten dieselbe Toxizität.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle VI aufgeführt.

Tabelle VI.

Erwärmung in Tagen	$p_{H^{\cdot}}$ = 7,40 bei 35°				$p_{H^{\cdot}}$ = 8,35 bei 35°			
	25°	30°	35°	40°	25°	30°	35°	40°
0	143	143	143	143	143	143	143	143
2	133	125	125	100	111	100	91	71,4
5	118	111	100	91	100	91	91	50
9	118	111	91	83,3	100	83,3	71,4	37
18	111	100	91	71,4	91	83,3	62,5	31,3
30	111	100	83,3	66,7	91	83,3	58,8	25

Die Zahlen geben die Toxineinheiten pro ccm an.

In der Abb. 7 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

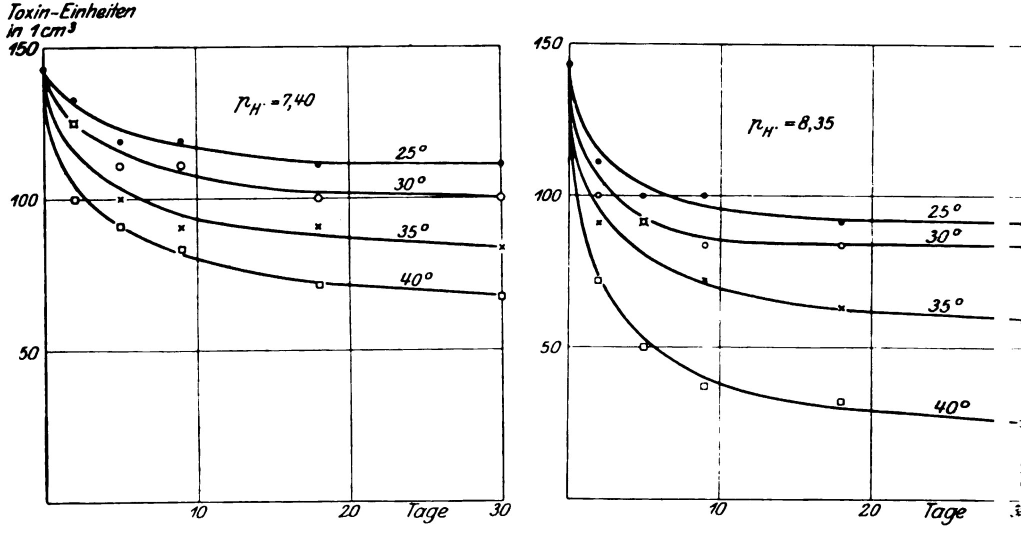


Abb. 7. Abschwächung des Diphtherietoxins bei verschiedenen Temperaturen.

Es geht hieraus hervor, welche beträchtliche Rolle sowohl die Temperatur als die Wasserstoffionenkonzentration bei der Abschwächung des Diphtherietoxins spielen. Die Geschwindigkeit der Abschwächung ist anfangs am größten, um danach allmählich abzunehmen.

c) Die Toxinbildung.

Roux und *Yersin*[7]) haben zuerst beobachtet, daß zwischen der Reaktion der Kultur und der Toxinbildung eine Beziehung besteht, und machten ferner darauf aufmerksam, daß größere Toxinmengen nur in den älteren und alkalischen Kulturen zu finden waren. Diese Beobachtungen wurden von *Spronck*[2]) ebenso wie von *Madsen*[3]) bestätigt und erweitert. Sie zeigten, in welchen verschiedenen Richtungen Diphtheriekulturen sich entwickeln können, und suchten die möglichen Ursachen

dieser Entwicklung zu erklären. So wurde von *Madsen* dargetan, welche Bedeutung der anfänglichen Reaktion der Bouillon für die Entwicklungsrichtung, d. h. für das Sauer- oder Alkalischwerden der Kultur, beigemessen werden muß; er gibt 2 Titergrenzen an, außerhalb welcher der Bouillontiter liegen muß, damit man die Entwicklungsweise mit Sicherheit voraussagen kann; innerhalb dieser Grenzen ist die Entwicklungsrichtung dagegen eine unsichere. Die Feststellung der Reaktion findet teils mittels Lackmuspapier, teils durch Titrieren statt. Die stark sauren Kulturen waren atoxisch, während die stark alkalischen in den meisten Fällen — nicht immer — toxisch waren.

Während ich mit diesen Fragen beschäftigt war, habe ich im ganzen 99 an verschiedenen Zeitpunkten dargestellte Bouillonpräparate und Kulturen untersucht, von welchen die meisten aus recht großen Ansätzen (ca. 40—50 Liter) stammten; in der untenstehenden Tabelle VII habe ich die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengestellt, wobei ich die Grenze zwischen sauer und alkalisch bei $p_{H^\cdot} = 7{,}00$ gezogen habe. In der letzten Kolonne sind die erzielten Toxinstärken angeführt.

Tabelle VII.

Anfangs-$p_{H^\cdot}$ der Bouillon	Anzahl der Kulturen	Reaktion des Toxins		D. m. L.
		alkal.	sauer	
oberhalb 7,20	61	61	—	0,0015—0,15
7,00—7,20	4	2	2	alkal. 0,0045—0,005, sauer 0,004—0,1
6,80—7,20	10	7	3	„ 0,003 —0,02 „ 0,004—>0,1
6,60—6,80	9	4	5	„ 0,0032—0,01 „ 0,005—>0,1
unterhalb 6,60	15	—	15	0,005 —>0,1

Diesen Versuchen zufolge wird eine Kultur immer alkalisch (d. h. $p_{H^\cdot} > 7{,}0$*), wenn die Anfangswasserstoffionenkonzentration größer als ca. 7,20 ist, während die Kultur immer sauer wird (d. h.* $p_{H^\cdot} < 7{,}0$*), wenn der Aciditätsgrad der Bouillon kleiner als* $p_{H^\cdot} =$ *ca. 6,60 ist. Kulturen, deren* $p_{H^\cdot}$ *anfänglich zwischen* $p_{H^\cdot}$ *ca. 6,60 und ca. 7,20 liegt, können sich ebenso wohl nach der einen wie nach der anderen Richtung hin entwickeln.*

Diese Zahlen, welche prinzipiell die erwähnten früheren Beobachtungen bestätigen, dürfen natürlich nicht als absolute betrachtet werden, da sie keineswegs für alle Substrate, unangesehen ihrer Darstellungsweise, Geltung haben können; besonders ist natürlich die Menge der vergärbaren Kohlenhydrate und anderer Körper, die während des Wachstums eine starke Säurebildung veranlassen können, von bestimmenden Einfluß auf diese Verhältnisse, ebenso wie es denkbar ist, daß andere Bakterienstämme von dieser Regel abweichen können.

Die Toxinbildung in den erwähnten Kulturen variiert, wie erwartet, außerordentlich; die ältere Anschauung aber, der zufolge Toxin nicht

oder jedenfalls nur in geringer Menge in den stark sauren oder stark alkalischen Kulturen zu finden ist, wird bestätigt; *man sieht jedoch, daß in den Kulturen, deren* $p_{H^{\cdot}}$ *unterhalb 7,00 liegt, welche somit auf Lackmuspapier sauer reagieren, sehr wohl beträchtliche Toxinmengen vorhanden sein können,* was wahrscheinlich mit der früheren Anschauung, daß große Toxinkonzentrationen nur in alkalischen Kulturen zu finden sind, nicht übereinstimmt. Jedoch finden sich große Toxinmengen nur in Kulturen, die ganz schwach sauer sind ($p_{H^{\cdot}}$ ca. 6,7—6,8); bei $p_{H^{\cdot}}$ 6,3—6,5 sind in der Regel nur unbeträchtliche Mengen vorhanden, und in noch saueren Kulturen ist kein Toxin mehr nachweisbar. Es muß jedoch zugegeben werden, daß es am reichlichsten in den Kulturen auftritt, die ziemlich stark alkalisch werden; wird die Alkalinität zu groß (d. h. mehr als $p_{H^{\cdot}}$ 8,5—8,7), so sinkt jedoch der Toxingehalt in der Regel bedeutend, und Kulturen mit einem $p_{H^{\cdot}} > 8,7$ sind meistens atoxisch.

Außer diesen Untersuchungen habe ich einige Versuchsreihen mit dem besonderen Zweck ausgeführt, *die Bedeutung des Anfangs-*$p_{H^{\cdot}}$ *der Bouillon für die Toxinbildung zu beleuchten.* Vorher will ich jedoch einzelne früher ausgeführte Versuche mitteilen, in welchen ich die Toxinbildung von Tag zu Tag verfolgt habe; diese waren notwendig, u. a. um zu wissen, wie lange die Kulturen im Brutschrank verbleiben sollten, bevor die größte Toxinkonzentration erreicht worden war. Im ganzen wurden 3 Versuche ausgeführt, mit Pepton Witte 2 und 1 Versuch mit Pepton Chapoteaut; die Versuche sind dieselben wie die auf S. 35 erwähnten, deren Resultate in den Tabellen II, III und IV und in Abb. 4 zu finden sind. Die in den letzten Kolonnen der Tabellen angeführten Toxinmessungen sind in der Abb. 5 graphisch dargestellt. Beim Vergleichen beider Abbildungen, die der größeren Anschaulichkeit halber auf der gleichen Seite abgedruckt sind, erhält man einen Eindruck von der Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentrations-Änderungen für Bildung und Erhaltung des Toxins. Die Toxinbildung scheint erst recht einzusetzen, nachdem der Aciditätsgrad der Kultur nach dem ersten Ansteigen wieder abzunehmen beginnt; darauf erfährt sie ein starkes Ansteigen mit zunehmender Alkalinität bis zum 12. bis 15. Tag, um dann wieder abzunehmen, während die Flüssigkeit fortwährend alkalischer wird. Die gewöhnliche Annahme, nach welcher diese zunehmende Alkalinität die Ursache des Absteigens der Toxinkurve sei, ist sicher in der Hauptsache richtig, aber in den beiden erwähnten Versuchen mit Pepton Witte fängt das Abfallen der einen Kurve bei $p_{H^{\cdot}} = 8,25$ an, während die andere schon bei $p_{H^{\cdot}} = 7,40$ zu fallen beginnt; betrachten wir die eben beschriebenen Untersuchungen über die Abschwächung des Diphtherietoxins bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen, so bekommt man den Eindruck, *daß die Vernichtung*

des Toxins, d. h. das Sinken der Toxinkurve, nicht immer und nicht ausschließlich der in der Kultur vorhandenen Wasserstoffionenkonzentration zugeschrieben werden kann; es müssen andere Faktoren vorhanden sein, die an diesen Prozessen teilnehmen, und deren Bedeutung unter gewissen Umständen eine beträchtliche sein muß.

Es geht indessen aus den Versuchen hervor, daß die Kulturen nach ca. 12—13tägigem Wachstum aus dem Brutschrank herausgenommen werden dürfen; in den folgenden Versuchen sind die Kulturen nach dem 12. Tage herausgenommen worden. Die Resultate dieser Versuche über *die Bedeutung der Anfangsreaktion der Bouillon für die Toxinbildung* sind an den Tabellen VIII, IX, X und XI angeführt und graphisch in der Abb. 8 dargestellt. Es geht — trotz der unvermeidlichen Unregel-

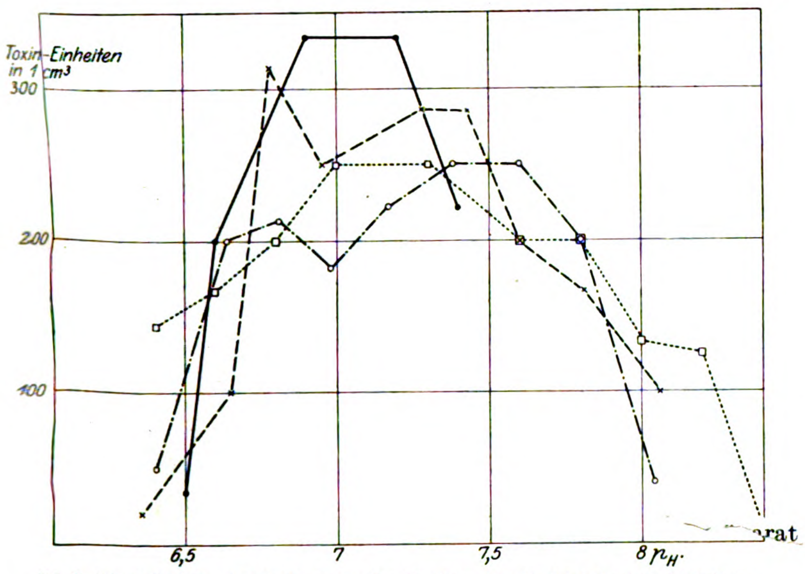


Abb. 8. Die Bedeutung des Anfangs-p_{H}· der Bouillon für die Diphtherietoxinbildung.

mäßigkeiten — deutlich daraus hervor, welche außerordentlich große Rolle die Anfangsreaktion der Bouillon spielt; in großen Zügen darf man aus den Versuchen den Schluß ziehen, *daß eine Reaktion, deren p_H kleiner als ca. 6,5 und größer als ca. 8,00 ist, für die Toxinbildung gewöhnlich ungünstig sein wird, während diese innerhalb eines Intervalles zwischen p_H· ca. 6,8 und ca. 7,7 fast gleichartig verläuft, weswegen es richtig erscheint, eine Anfangsreaktion von p_H· = ca. 7,2—7,3 zu wählen.*

John W. Bunker[5]) gibt p_H· = 7,0—7,1 als die günstigste Anfangs-Wasserstoffionenkonzentration an; diese Angabe fällt mit den von mir erzielten Resultaten einigermaßen zusammen und liegt wohl ein wenig unterhalb des Alkalescenzgrades, welcher früher, als man sich mit

Lackmuspapier und Phenolphthalein helfen mußte, als der zweckmäßigste bezeichnet wurde. Andererseits teilt *Lewis Davis*[13]) mit, daß eine starke Toxinbildung erzielt wird, falls die Reaktion der Bouillon zwischen $p_{H^{\cdot}}$ 7,2 und 8,3 liegt, und *v. Gröer* und *Srnka*[4]) geben ein Optimum bei $p_{H^{\cdot}} = 7,8$ an.

Es ist wohl kaum möglich, in dieser Beziehung optimale Bedingungen festzustellen, die für alle Nährböden und alle Laboratorien Geltung

Tabelle VIII.

Toxin V 1920		Wachstum	Geruch des fertigen Toxins	Toxineinheiten pro ccm
$p_{H^{\cdot}}$ vor dem Impfen	$p_{H^{\cdot}}$ im fertigen Toxin			
7,4	7,9	üppig	typisch	222
7,2	7,6	„	„	333
6,9	7,3	„	„	333
6,6	6,8	gut	„	200
6,5	6,3	ziemlich gut	schwach typisch	33,3
6,3	5,8	schlecht	atypisch	<10
6,2	5,6	„	„	<10
6,1	5,5	„	„	<10

Tabelle IX.

Toxin X 1920		Wachstum	Geruch des fertigen Toxins	Toxineinheiten pro ccm
$p_{H^{\cdot}}$ vor dem Impfen	$p_{H^{\cdot}}$ im fertigen Toxin			
8,4	8,40	üppig	atypisch	40
7,80	7,85	„	typisch	200
7,60	7,73	„	„	250
7,38	7,73	„	„	250
7,17	7,55	„	„	222
6,98	7,55	„	„	182
6,81	7,40	„	„	213
6,64	7,25	„	„	200
6,40	6,81	gut	schwach typisch	50
6,24	6,21	schlecht	atypisch	<10

Tabelle X.

Toxin XII 1920		Wachstum	Geruch des fertigen Toxins	Toxineinheiten pro ccm
$p_{H^{\cdot}}$ vor dem Impfen	$p_{H^{\cdot}}$ im fertigen Toxin			
8,06	8,15	üppig	schwach typisch	100
7,81	8,10	„	typisch	167
7,60	8,00	„	„	200
7,43	7,90	„	„	286
7,28	7,80	„	„	286
6,95	7,80	„	„	250
6,78	7,70	„	„	313
6,65	7,50	gut	„	100
6,35	7,30	„	atypisch	20

haben; jedes Laboratorium muß mit Hinblick auf die dort verwendete Darstellungsweise und übrige lokale Verhältnisse, durch eigene Versuchsreihen diese Bedingungen ausfindig machen.

Produktion von Diphtherietoxin in Bouillon mit verschiedenen $p_{H^{\cdot}}$.

Tabelle XI.

Toxin XIV 1920		Wachstum	Geruch des fertigen Toxins	Toxineinheiten pro ccm
$p_{H^{\cdot}}$ vor dem Impfen	$p_{H^{\cdot}}$ im fertigen Toxin			
8,40	8,51	schlecht	atypisch	6,67
8,20	7,85	gut	schwach typisch	125
8,00	7,60	üppig	typisch	133
7,80	7,38	"	"	200
7,60	7,30	"	"	200
7,30	7,20	"	"	250
7,00	7,00	"	"	250
6,80	7,10	"	"	200
6,60	6,90	"	"	167
6,40	6,47	gut	"	143

Ich will hier die Resultate einer Versuchsreihe mitteilen, welche ich nach der Beendigung der soeben erwähnten Versuche ausgeführt habe; der Zweck derselben war, zu untersuchen, ob die Geschwindigkeit, mit der das Toxin gebildet wird, von der Anfangsreaktion abhängig ist.

In den 3 früher mitgeteilten Versuchen dieser Art (Abb. 5) war $p_{H^{\cdot}} = 7{,}73$, 7,60 und 6,95; teils waren aber die beiden ersteren Nährböden mit Pepton Witte und der dritte mit Pepton Chapoteaut zubereitet, teils waren sie voneinander unabhängig und an verschiedenen Zeitpunkten ausgeführt worden, weshalb sich kaum ein Vergleich anstellen läßt.

Die neue Versuchsreihe wurde mit demselben Bouillonpräparat (Pepton Witte) ausgeführt, stand gleichzeitig im Brutschranke bei 36°, und wurde im ganzen so behandelt, daß der alleinige Unterschied in der Wasserstoffionenkonzentration der verschiedenen Bouillons gelegen war. Die wechselnde Reaktion wurde, wie gewöhnlich, durch Zusatz von steriler calcinierter Soda in den untenstehenden Mengen bewerkstelligt:

für $p_{H^{\cdot}}$ 6,5 wurde 0,09% Soda verwendet,
für $p_{H^{\cdot}}$ 7,0 „ 0,29% „ „
für $p_{H^{\cdot}}$ 7,5 „ 0,41% „ „
für $p_{H^{\cdot}}$ 8,0 „ 0,60% „ „

Die Ergebnisse sind in Tabelle XII zusammengestellt und in der Abb. 9 aufgezeichnet.

Tabelle XII.

Tage im Brutschrank	$p_{H^{\cdot}}$ = 6,5		$p_{H^{\cdot}}$ = 7,0		$p_{H^{\cdot}}$ = 7,5		$p_{H^{\cdot}}$ = 8,0	
	$p_{H^{\cdot}}$	Toxineinheiten	$p_{H^{\cdot}}$	Toxineinheiten	$p_{H^{\cdot}}$	Toxineinheiten	$p_{H^{\cdot}}$	Toxineinheiten
5	6,40	40	7,38	182	8,00	189	7,95	125
7	7,00	71,4	7,73	250	8,04	270	8,25	167
10	7,40	111	8,10	400	8,25	270	8,65	100
12	8,00	125	8,35	435	8,60	233	8,60	100
15	8,17	143	8,50	435	8,70	208	8,65	50
20	8,25	125	8,65	167	8,70	59	8,65	20
25	8,25	77	8,82	167	8,85	40	8,55	10
31	8,35	4,4	8,85	62,5	8,5	18	8,60	6,7

Diese Versuche zeigen einen großen Unterschied, und zwar nicht nur betreffs der gebildeten Toxinmengen, sondern auch in bezug auf die Geschwindigkeit, mit der das Toxin gebildet wird. Obwohl die Kurven nicht völlig regelmäßig verlaufen, geht jedoch deutlich daraus hervor, *wie das Optimum der Toxinbildung verschoben wird.*

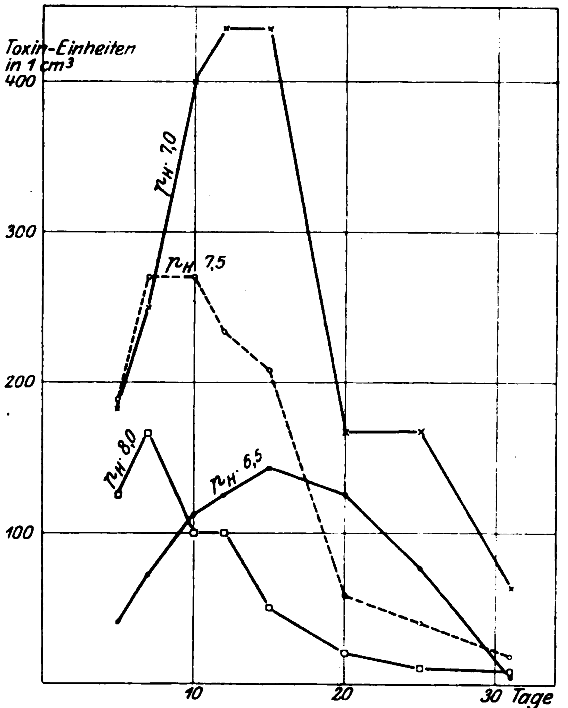


Abb. 9. Die Bedeutung des Anfangs-$p_{H^{\cdot}}$ der Bouillon für die Diphtherietoxinbildung.

Mit einem Anfangs-$p_{H^{\cdot}}$ = 6,5: Optimum nach etwa 15 Tagen, mit einem Anfangs-$p_{H^{\cdot}}$ = 7,0: Optimum nach etwa 13 Tagen, mit einem Anfangs-$p_{H^{\cdot}}$ = 7,5: Optimum nach etwa 8—9 Tagen, mit einem Anfangs-$p_{H^{\cdot}}$ = 8,0: Optimum nach etwa 7 Tagen.

Diese Verschiebung des Optimums steht unzweifelhaft mit der Änderung des $p_{H^{\cdot}}$ in den Kulturen in Verbindung, denn, wie aus der Tabelle XII hervorgeht, wird das Ansteigen der Alkalescenzkurve mit zunehmendem Anfangs-$p_{H^{\cdot}}$ immer steiler.

Man bemerkt sofort, daß das Bildungsoptimum in diesen Kulturen bei $p_{H^{\cdot}} = 7{,}5$ sich früher (ca. am 8. bis 9. Tage) als in den vorausgehenden Versuchen (am 12. bis 15. Tage) einstellt; hierdurch wird angedeutet, daß andere Faktoren als eben die Wasserstoffionenkonzentration in dieser Beziehung von Bedeutung sind, und ein neuer Beweis für die Tatsache gegeben, daß man mit Vergleichen von Versuchen, die mit an verschiedenen Zeitpunkten zubereiteten Nährböden angestellt worden sind, sehr vorsichtig sein muß.

Um festzustellen, welcher Zeitpunkt für die Herausnahme des Toxins aus dem Brutschranke am günstigsten ist, schlägt *Bunker*[5]) vor, durch Probeentnahme die Alkalescenz zu prüfen und das Wachstum, wenn das $p_{H^{\cdot}}$ 8,00—8,20 ist, zu unterbrechen, weil erst dann das Toxin „reif" ist. Diese Methode wird in vielen und vielleicht in einer Mehrzahl von Fällen ausgezeichnet sein; aber wie es aus dem Versuche in Abb. 4 und 5 ersichtlich, ist sie nicht immer anwendbar.

Außer den erwähnten Faktoren ist indessen noch ein anderer für den Verlauf der Toxinbildung von großer Bedeutung, nämlich *die Temperatur.* Die diesbezüglichen Literaturangaben sind spärlich, weil man wohl davon ausgegangen ist, daß dieser stark menschenpathogene Bacillus sein Wachstums- und Giftbildungsoptimum bei der normalen Körpertemperatur des Menschen (37°) hat. Es wird jedoch von *Madsen*[3]) betont, daß es notwendig ist, darauf zu achten, daß die Temperatur für die Kulturen, welche verglichen werden sollen, dieselbe ist, und er bemerkt ferner, daß die Giftbildung bei Temperaturen zwischen 31° und 37° scheinbar auf dieselbe Weise vor sich geht, während Temperaturen von 39 und 40° schlechtes Wachstum geben und oft ein Sauerwerden der Kultur verursachen. *Bunker*[5]) gibt als die beste Temperatur 36° an, während *Lewis Davis*[1]) bei einer Temperatur zwischen 36° und 38° arbeitet. Auf Grund des außerordentlich großen Einflusses der Temperatur auf die Abschwächung des Diphtherietoxins empfiehlt *Madsen*[12]) die Züchtung bei einer etwas niedrigeren Temperatur, nämlich 33—35° vorzunehmen, und auch *Park* und *Williams*[14]) verwenden 35°.

Da diese Angaben nicht ganz übereinstimmen und rationelle Untersuchungen betreffs dieses wichtigen Punktes meines Wissens nicht gemacht worden sind, habe ich den untenstehenden Versuch ausgeführt: Nach der oben angegebenen Methode wurde eine sehr große Portion Bouillon, 70 Liter, auf einmal zubereitet und nach der Darstellung auf Erlenmeyerkolben (700 ccm pro Kolben) gefüllt, dieselben in gewöhnlicher Weise geschlossen und sterilisiert; diese Bouillonmenge war für 4 Versuche bei den Temperaturen 32°, 34°, 36° und 38° bestimmt und war so reichlich, daß zu jeder Probe 4 Kolben (= 2,8 Liter) entnommen werden konnten, welche nach Zusammenmischen in gewöhnlicher Weise

geprüft wurde; es war notwendig den Versuch in so großem Maßstabe anzustellen, damit eine hinlängliche Gleichartigkeit in den Versuchsreihen erzielt werden konnte. Da nur ein Thermostat von der erforderlichen Größe zu meiner Verfügung stand (Luftthermostat mit elektrischer Heizung und Regulation), ließen sich die 4 Versuche nicht gleichzeitig ausführen, weshalb die Mehrzahl der Kolben, vor Verdampfung geschützt, im Kühlraum aufgehoben wurden. Es liegt kaum ein Grund vor, zu glauben, daß in dem Nährboden während dieses Aufhebens wesentliche Veränderungen vor sich gehen könnten, besonders, weil er nicht alkalisch gemacht worden war, sondern seine ursprüngliche Wasserstoffionenkonzentration $p_{H^{\cdot}}$ = ca. 6,3 besessen hatte. Unmittelbar vor dem Anfang eines Versuches wurde die nötige Anzahl Kolben in gewöhnlicher Weise durch Zusatz von steriler calcinierter Soda alkalisch gemacht, so daß $p_{H^{\cdot}}$ 7,3 wurde, wobei der Einfluß der Temperatur auf die Wasserstoffionenkonzentration natürlich berücksichtigt wurde. Die erste Probeentnahme fand nach 5tägigem

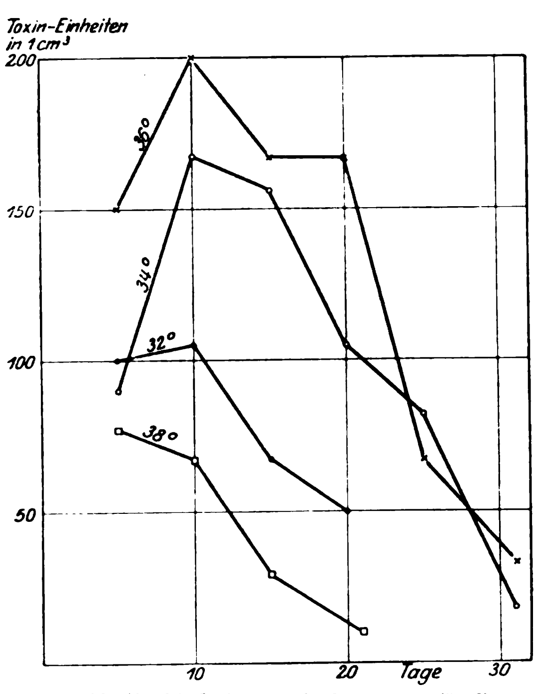


Abb. 10. Die Bedeutung der Temperatur für die Diphtherietoxinbildung.

Tabelle XIII.

Tage im Thermostat	32°		34°		36°		38°	
	$p_{H^{\cdot}}$	Toxineinheiten	$p_{H^{\cdot}}$	Toxineinheiten	$p_{H^{\cdot}}$	Toxineinheiten	$p_{H^{\cdot}}$	Toxineinheiten
5	7,75	100	7,70	90	7,60	150	7,85	77
10	8,15	105	8,25	167	8,25	200	8,40	67
15	8,55	67	8,50	156	8,70	167	8,75	29
20	8,60	50	8,65	105	8,80	167	—	—
21	—	—	—	—	—	—	8,60	10
25	—	—	8,65	82	8,80	67	—	—
31	—	—	8,70	18	8,85	33	—	—

Die Kurven sind auf Abb. 10 gezeichnet.

Aufenthalt im Thermostat statt und die späteren Proben wurden in 5tägigen Zwischenräumen entnommen. Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle XIII zusammengestellt.

Aus diesen Versuchen und aus einem anderen übereinstimmenden geht hervor, daß der Einfluß der Temperatur auf die Toxinbildung ein bedeutender ist und ferner, daß das *Optimum bei ca. 36° liegt.* Da die Versuche nur in Intervallen von 2° ausgeführt worden sind, ist es schwierig zu entscheiden, ob das Optimum bei 35°, 36° oder 37° liegt. Zeichnen wir die Ergebnisse am 10. Tage auf, wie in Abb. 11, so erkennt man, daß die Kurve auf verschiedene Weisen gezogen werden kann; aber selbst wenn das Optimum vielleicht näher bei 35° oder 37° liegt, wird dies kaum eine größere Rolle für die erzielte Toxinkonzentration spielen. Da die Kurve außerordentlich schnell abfällt, sobald die Temperatur sich 38° nähert, dürfte es wohl *am sichersten sein, bei einer Temperatur wzischen 36° und 36,5°, keinesfalls aber oberhalb 37°, zu arbeiten.*

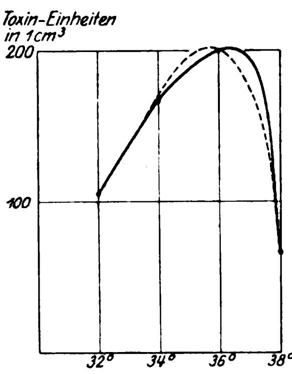


Abb. 11. Die Bedeutung der Temperatur für die Diphtherietoxinbildung.

d) Läßt sich das p_H während des Wachstums konstant halten?

Den oben erwähnten Untersuchungen zufolge darf es als sicher betrachtet werden, daß die starke alkalische Reaktion, die sich allmählich in den Kulturen einstellt, jedenfalls überwiegend die Ursache des Fallens der Toxinkurve ist, weshalb es für die Erhaltung der in den Kulturen gebildeten Toxinmengen wahrscheinlich von großem Nutzen sein würde, die Schwankungen der Reaktion durch Pufferzusatz innerhalb gewisser Grenzen zu halten; es ist indessen möglich, daß eine gewisse Änderung in der Wasserstoffionenkonzentration sich als günstig erweist, denn die größten Toxinmengen werden eben während des ersten Ansteigens der Alkalescenskurve gebildet.

Da es in diesem Falle von Bedeutung wäre, ein höheres Ansteigen des p_H als bis zu etwa 7,8 zu verhindern, dürfte eine Phosphatmischung als besonders geeignet erscheinen. Da alle Phosphate bei $p_H = 8,3$ in sekundäres Salz umgebildet worden sind, habe ich in einem zweiten Versuche außer den phosphorsauren Salzen zugleich Glycin (Glykokoll) hinzugefügt, welches, falls die Reaktion trotz der Gegenwart von Phosphaten noch alkalischer werden würde, als Puffer wirken könnte. In dem Versuche mit Phosphaten allein habe ich 1% und in dem zweiten 1% Glycin und 0,5% Phosphate verwendet. Die Salze wurden zur sauren Bouillon gegeben, und diese nach der Autoklavensterilisation

in gewöhnlicher Weise mittels calcinierter Soda bis $p_{H^{\cdot}} = 7{,}40$ alkalisch gemacht. Die Versuchsresultate sind in der Tabelle XIV aufgeführt.

Tabelle XIV.

$p_{H^{\cdot}} = 7{,}40$.

Tage im Thermostate	Phosphate		Phosphate + Glykokoll	
	$p_{H^{\cdot}}$	Toxin-einheiten	$p_{H^{\cdot}}$	Toxin-einheiten
1	7,25	—	7,35	—
2	7,45	—	7,55	—
3	7,60	33	7,85	—
5	7,80	100	8,04	< 5
7	7,95	100	—	—
9	8,20	111	8,30	80
12	8,35	80	—	—
13	—	—	8,25	111
16	8,60	100	—	—
18	—	—	8,40	100
20	8,60	100	—	—
23	—	—	8,40	100
25	8,70	40	—	—
30	8,80	25	8,40	66

Diese Versuche zeigen, daß Phosphate und Glykokoll bei den verwendeten Konzentrationen anscheinend gar keine reaktionsregulierende Wirkung besitzen, da die Alkalescens der Kulturen ebenso hoch wie in entsprechenden Versuchen ohne Zusatz dieser Salze steigt. Falls durch derartige Zusätze etwas erreicht werden soll, müssen diese sicher in weit größeren Konzentrationen verwendet werden; große Salzmengen wirken jedoch — wie wir später sehen werden — auf die Toxinbildung*) stark hemmend.

Es ist ja möglich, daß eine Pufferwirkung durch Verwendung von völlig andersartigen Stoffen erreicht werden könne. Ich habe aber keine derartigen Versuche ausgeführt.

C. Die Bedeutung der Zusammensetzung des Nährbodens für die Toxinbildung.

Es wäre natürlich auch beim Studium der Bildung des Diphtherietoxins von Bedeutung, wenn man für die Darstellung einen Nährboden von bekannter oder wenigstens einigermaßen bekannter Zusammensetzung verwenden könnte.

Die ersten Versuche, einen derartigen Nährboden zu finden, wurden von *Guinochet*[15]) gemacht; er gab an, daß Diphtheriebacillen in eiweißfreiem Harn nicht nur wachsen konnten, sondern darin auch Toxin bildeten. Diese Beobachtung wurde später von *Uschinsky*[16]) bestätigt,

*) Die Toxinbildung in den angeführten Versuchen ist übrigens eine ziemlich geringe.

welcher ferner mitteilte, daß Diphtheriebacillen in einem Nährboden, dessen alleinige Stickstoffquellen Ammoniumlactat und Natriumasparaginat waren, wachsen und Toxin bilden können. Im Gegensatze zu diesen Beobachtungen konnten *Fraenkel*[17]) und *Hoûgoûnnencq* und *Doyen*[18]) in keinem nennenswertem Grade eine Entwicklung von Diphtheriebacillen auf eiweißfreien Nährböden hervorrufen. 1907 hat *Hadley*[19]) diese älteren Angaben, besonders mit *Uschinskys* Nährboden durchgeprobt; trotzdem aber der Verfasser nicht weniger als 70 Diphtheriebacillenstämme untersucht hatte, gelang es ihm nicht, eine einzige zur Entwicklung zu bringen. *Hadley* dehnte die Versuche weiter aus und fand einen Nährboden, der aus Glykokoll, Ammoniumlactat, Glycerin, Natriumchlorid, Calciumchlorid, Magnesiumsulfat und Dicalciumphosphat zusammengesetzt war, und auf welchem die Bacillen nicht nur wuchsen, sondern auch Toxin bildeten. In der letzten Zeit sind diese Verhältnisse von *Lewis Davis* und *Newell S. Ferry*[20]) mit dem Resultate untersucht worden, daß Diphtheriebacillen in synthetischen, aus Aminosäuren und Mineralsalzen bestehenden Medien nicht gezüchtet werden können; auch nicht durch Zugabe von Kreatin, Kreatinin, Xanthin und Hypoxanthin. Nach einem Zusatz von nur 0,5% Bouillon wachsen dagegen die Bacillen; um aber Toxinbildung hervorzurufen ist ein Zusatz von 10% Bouillon erforderlich. Die Verfasser haben den Zusatz zahlreicher verschiedener Stoffe zur Bouillon durchprobiert, um Wachstum und Toxinbildung zu fördern, während die Mehrzahl dieser Versuche ein negatives Resultat ergeben hat, scheint ein Zusatz von *Cystin* einen fördernden Einfluß auf die Toxinbildung auszuüben.

Ich selbst habe im Laufe der Jahre wiederholt versucht, Diphtheriebacillen auf Nährböden bekannter chemischer Natur zu züchten; es ist mir aber niemals gelungen, trotzdem über mehrere Monate ausgedehnte Anpassungsversuche ausgeführt worden sind.

Wir sind daher bei Studium und Darstellung des Diphtherietoxins weiterhin auf die Verwendung des klassischen Nährbodens: Pepton-Bouillon angewiesen. *Park und Williams*[14]) haben zuerst das Pepton als wichtigen Bestandteil des Kultursubstrates bei der Darstellung von Diphtherietoxin besonders hervorgehoben. Die Verfasser unternahmen einige Versuche mit wechselnden Peptonmengen und fanden, daß die Toxinstärke mit zunehmendem Peptongehalt vermehrt wurde, indem sie mit 2—4% Pepton stärkeres Toxin als mit 1% erhielten. *Theobald Smith*[21]) bestätigt diese Beobachtung. Gewöhnlich wird Pepton Witte verwendet; jedoch gibt *Madsen*[12]) an, daß er mit Pepton Chapoteaut gute Resultate erhalten hat; *Berry, Jane L.*[22]) hat mehrere Peptonsorten zur Darstellung von Diphtherie- und Tetanustoxin untersucht, Pepton Witte aber ergab die besten Resultate. Von *Bunker*[5]) wurden zur Diphtherietoxindarstellung 20 verschiedene Peptonsorten durch-

probiert, aus welchen mehrere in seinem eigenen Laboratorium dargestellt worden waren, aber auch *Bunker* fand, daß Pepton Witte am besten geeignet war.

1898 veröffentlichte *Martin*[23]) eine Methode zur Darstellung eines Nährbodens durch Selbstverdauung von Schweinemagen und Mischen mit Fleischinfus, in welchem der Muskelzucker mittels Hefe vergoren worden war. Dieser Nährboden ist wegen seiner Wohlfeilheit vorteilhaft, aber wegen der Schwierigkeiten bei seiner Zubereitung und der Unsicherheit betreffs der schließlichen Zusammensetzung dieses Nährbodens konnte diese Methode die weit teurere, zu welcher Handelspepton verwendet wird, nicht verdrängen. Es scheint mir auch einleuchtend zu sein, daß es leichter gelingen wird, einigermaßen gleichartige Nährböden bei der Verwendung von käuflichem Pepton zu erzielen, weil die Darstellung desselben eine gewisse Gleichartigkeit gewährleistet, während eine Methode wie die *Martin*sche, welche u. a. Schwankungen des Peptongehalts in dem fertigbereiteten Nährboden nicht ausschließen kann, wechselnde Resultate betreffs der Toxinbildung veranlassen wird.

Anläßlich der Methode von *Martin* bemerkt *Davis*[1]): „as would be expected, from its composition, this medium did not give succesful results in the hands of other investigators and found little application in practice.“

Für die Darstellung der Bouillon wird gewöhnliches *Kalbfleisch* verwendet, weil dies in den meisten Laboratorien die besten Resultate zu geben scheint. Auch *Rindfleisch* wird benutzt und ist nach den neusten Untersuchungen von *Lewis Davis*[1]) ebenso gut wie Kalbfleisch. *Pferdefleisch* ist mit gutem Resultate u. a. von *Aronson*[24]) und *Zinno*[25]) zur Verwendung gebracht, während *Smirnow*[26]) eine schlechte Toxinbildung damit erhielt. *v. Gröer* und *Srnka*[4]) empfehlen für die Darstellung der Bouillon *Placenta*; die dadurch erzielten Toxinstärken wirken aber keineswegs überzeugend von der Verwendbarkeit eines derartigen Nährbodens.

Da Fleischinfuse oft etwas Kohlenhydrate enthalten, welches Säurebildung in den Diphtheriekulturen veranlaßt, werden diese oft vor der Bereitung der Bouillon durch Gärung beseitigt. *Spronck*[2]) hat zuerst darauf aufmerksam gemacht, und die Kohlenhydrate ganz einfach durch Liegenlassen des Fleisches beseitigt. *Martin*[27]) vergor den Muskelzucker mittels Hefe, während *Theobald Smith*[21]) eine Colikultur verwendete. Es wurde indessen von *Th. Smith* gefunden, daß ein Zusatz von 0,2% Traubenzucker zu der zuckerfreien Bouillon ein kräftigeres Wachstum und eine stärkere Toxinbildung verursachte; dieser eigentümliche Unterschied zwischen Muskelzucker und dem später hinzugefügten Traubenzucker wird von *Smith* durch die Annahme erklärt, daß die vom Muskelzucker gebildeten sauren Produkte von den

aus der Dextrose gebildeten verschieden und vielleicht für die Diphtheriebacillen unverwendbar seien; jedoch führt der Verfasser auch an, daß durch die Gärung gewisse Hemmungskörper in der Bouillon beseitigt werden können. Trotzdem es noch nicht gelungen ist, eine befriedigende Erklärung dieser Verhältnisse zu finden, findet diese Methode eine ausgedehnte Verwendung, und es ist eine allgemeine Anschauung, daß durch sie bessere Resultate erhalten werden. Nach den Untersuchungen von *Lewis Davis*[1]) ist diese Coligärung jedoch ganz überflüssig.

Es sind inzwischen viele Vorschläge für die Darstellung geeigneter Nährböden gemacht worden. So wird von *Spronck*[28]) empfohlen, einen Absud von Hefe mit Peptonzusatz zu verwenden, womit er ein 20mal stärkeres Toxin als mit Peptonbouillon erhalten hat. *v. Dungern*[29]) erhielt in einer Ascitesbouillon ein 12mal stärkeres Toxin. *Cartwright Wood*[30]) empfiehlt einen Serumzusatz zur Bouillon, *Zinno*[25]) durch Pepsinverdauung von verschiedenen Organen, z. B. Gehirn dargestellte Nährböden, während *Hida*[31]) meint, in Extrakten aus Klettenwurzeln oder in mit Salzsäure gespaltetem Inulin wertvolle Zusätze zur Bouillon gefunden zu haben, und jüngst wurde von *G. H. Robinson* und *Meader*[32]) vorgeschlagen, Stückchen von frischer und steril entnommener Meerschweinchenleber zur Bouillon zuzusetzen.

Ich habe im hiesigen Institut dann und wann viele der allmählich erschienenen diesbezüglichen Vorschläge einer Prüfung unterzogen, bin aber immer zur gewöhnlichen Peptonbouillon als dem geeignetsten Nährboden zurückgekehrt. Da indessen, wie allgemein bekannt, die Nährböden durch Erwärmen etwas an Verwendbarkeit verlieren und die dadurch stattfindenden Umbildungen in alkalischer Flüssigkeit größer als in saurer sind, habe ich vor einigen Jahren die Änderung eingeführt, die Bouillon bei ihrem ursprünglichen Aciditätsgrad (p_H = ca. 6,3) zu sterilisieren und unmittelbar vor dem Impfen mit sterilisierter calcinierter Soda alkalisch zu machen. Bei diesem Vorgehen erhält man natürlich keine klare Züchtungsflüssigkeit, was aber für diesbezügliche Zwecke nicht von Belang ist. Für sämtliche hier mitgeteilte Versuche wurde eine wie auf S. 33 angegebene Bouillon verwendet.

a) Die Bedeutung der Fleischkonzentration.

Gewöhnlich wird zur Darstellung von Diphtheriebouillon 1 Teil Fleisch auf 2 Teile fertiggestellter Bouillon verwendet. *Dean* (in 12 ref.) verwendete jedoch die doppelte Fleischmenge, und zwar 1 Teil Fleisch auf 1 Teil fertiggestellter Bouillon.

Um die Bedeutung der Fleischkonzentration zu untersuchen, ist folgender Versuch angestellt worden; in gewöhnlicher Weise wurde eine Bouillon dargestellt, für welche 1 kg Kalbfleisch pro Liter zur Ver-

wendung kam (diese Konzentration wird: 100% Fleisch bezeichnet); durch Verdünnen mit Wasser wurden die unten angegebenen Stärken zubereitet, und für sämtliche 1,5% Pepton Witte und 0,5% Natriumchlorid verwendet. Nach der Sterilisation wurde die Wasserstoffionenkonzentration mittels calcinierter Soda auf $p_{H^·} = 7,3$ gebracht. Hierzu benötigte ich die untenstehenden Sodamengen:

100%	Fleisch	—	0,60%	calcinierte	Soda
75%	„	—	0,45%	„	„
50%	„	—	0,29%	„	„
25%	„	—	0,13%	„	„
10%	„	—	0,033%	„	„
5%	„	—	0	($p_{H^·}$ war 7,50).	

Die Kulturen standen 12 Tage im Brutschrank. Die Ergebnisse sind in Tabelle XV angeführt.

Tabelle XV.

% Fleisch	$p_{H^·}$ im filtrierten Toxin	Das Wachstum	Toxineinheiten pro ccm
100	7,80	üppig	167
75	7,80	„	167
50	8,35	„	167
25	7,60	ziemlich gut	59
10	7,50	schlecht	33
5	7,78	„	25

Es geht hieraus hervor, *daß Fleischkonzentrationen von 100%, 75% und 50% dasselbe gute Resultat ergeben, während mit einer geringeren Konzentration eine schlechtere Toxinbildung erzielt wird.*

b) Die Bedeutung der Peptonkonzentration.

Das Pepton ist ein sehr bedeutsamer Bestandteil des Nährbodens, denn ohne diesen Zusatz ist nie ein starkes Diphtherietoxin dargestellt worden, gewöhnlich wird 1—1,5 oder 2% in der Bouillon verwendet, aber *Park* und *Williams*[14]) erhielten, wie früher erwähnt, mit größerem Peptongehalte (4%) eine stärkere Toxinbildung.

Für den untenstehenden Versuch kam gewöhnliche Kalbsbouillon mit 50% Fleisch (siehe unter *a*) und 0,5% Natriumchlorid zur Verwendung und ferner Pepton Witte in verschiedenen Konzentrationen. Für die Alkalisierung der sterilisierten Bouillon wurden die untenstehenden Sodamengen verwendet ($p_{H^·} = 7,30$):

5%	Pepton	—	0,46%	calcinierte	Soda.
2%	„	—	0,40%	„	„
1%	„	—	0,38%	„	„
0,5%	„	—	0,35%	„	„
0,25%	„	—	0,33%	„	„

Die Kulturen standen 12 Tage im Brutschrank. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle XVI.

Tabelle XVI.

% Pepton	$p_{H^{\cdot}}$ im filtrierten Toxin	Das Wachstum	Toxineinheiten pro ccm
5	8,25	üppig	111
2	8,20	„	100
1	8,00	gut	100
0,5	7,65	ziemlich gut	56
0,25	6,98	schlecht	< 2

Aus diesem und mehreren anderen übereinstimmenden Versuchen ist ersichtlich, *daß die Toxinbildung mit zunehmendem Peptongehalt steigt*; *man sieht jedoch bei 1%, 2% und 5% fast keinen Unterschied, wogegen 0,5% ein etwa nur halb so starkes Toxin gibt, während die Toxinbildung bei 0,25% Pepton fast erloschen ist.*

c) Die Bedeutung der NaCl-Konzentration.

In sämtlichen beschriebenen Darstellungsmethoden für Diphtheriebouillon wird ein Zusatz von 0,5% Chlornatrium angegeben; soviel ich weiß, ist aber nie untersucht worden, ob diese Konzentration am günstigsten ist oder ob der Chlornatriumgehalt überhaupt von Bedeutung ist.

Für den Versuch kam gewöhnliche Bouillon mit 50% Fleisch (siehe unter *a*), 1,5% Pepton Witte und verschiedene Salzmengen zur Verwendung. In sämtlichen Mischungen wurden für die Alkalisierung 0,25% calcinierte Soda ($p_{H^{\cdot}} = 7,30$) verwendet. Die Kulturen standen 12 Tage im Brutschrank. Das Resultat ist in der Tabelle XVII verzeichnet.

Tabelle XVII.

% NaCl	$p_{H^{\cdot}}$ im filtrierten Toxin	Das Wachstum	Toxineinheiten pro ccm
5	7,90	üppig	6,7
2	8,04	„	50
1	7,73	„	50
0,5	7,73	„	50
0,1	8,04	„	58

Es geht aus diesem und aus 2 anderen übereinstimmenden Versuchen hervor, *daß ein Chlornatriumgehalt bis ca. 2% für die Toxinbildung ohne Bedeutung ist, während ein größerer Gehalt (5%) — trotz üppigen Wachstums — die Toxinproduktion herabzusetzen scheint.*

d) Die Bedeutung der Sterilisation. Alkalisieren nach der Sterilisation.

Schon *Madsen*[3]) hatte die Aufmerksamkeit darauf gelenkt, daß die Erwärmung beim Sterilisieren der Bouillon, die Verwendbarkeit dieser

bezüglich der Toxinbildung herabsetzen kann, weshalb er Versuche mit Bouillon unternahm, welche teils im Autoklaven (115° und 134°), teils nur durch Kochen, teils nur durch Filtration durch Chamberlandkerzen sterilisiert worden war. Aus diesen Versuchen wurde von *Madsen* geschlossen, daß der Sterilisationsweise der Bouillon keine durchgreifende Bedeutung für die Toxinbildung beigemessen werden konnte.

Da die Bouillon jetzt nach einer etwas modifizierten Methode zubereitet wird, sah ich mich dazu veranlaßt, einzelne Versuche (2) über die Bedeutung des Erwärmens für die Toxinbildung zu unternehmen. Die Versuche wurden in ähnlicher Weise wie die entsprechenden Versuche mit Staphylolysin ausgeführt und ergaben folgende Resultate (Tabelle XVIII).

Tabelle XVIII.

	Vor dem Erwärmen alkalesciert			Nach dem Erwärmen alkalesciert		
	3×1/2 Std. bei 100°	10 Minuten bei 115°	2 Stunden bei 115°	3×1/2 Std. bei 100°	10 Minuten bei 115°	2 Stunden bei 115°
p_H vor und nach dem Erwärmen	7,90—7,65	7,90—7,45	7,90—6,95	6,15—6,10	6,15—5,95	6,15—5,90
Versuch A . .	100	10	< 10	63	200	10
p_H vor und nach dem Erwärmen	7,80—7,60	7,80—7,35	7,80—7,00	6,20—6,10	6,20—6,00	6,20—5,90
Versuch B . .	167	100	4	200	286	25

Nach dem Erwärmen wurde die Reaktion der Mischungen mittels Milchsäure oder Soda so korrigiert, daß p_H 7,20 war. Die Kulturen standen 11 Tage im Brutschranke bei 37°. Die angeführten Zahlen geben die Toxineinheiten in 1 ccm filtrierter Kultur an.

Diese Versuche zeigen, *daß die Toxinbildung in einer Bouillon am größten wird, wenn diese bei dem natürlichen Aciditätsgrade* (p_H *= ca. 6,15*) *sterilisiert und erst dann durch Hinzufügen von calcinierter Soda alkalisch gemacht worden ist.*

In den Versuchen, wo die Alkalisierung *vor* dem Sterilisieren stattgefunden hat, wird die größte Toxinbildung in der Bouillon erhalten, welche nach *Tyndall* sterilisiert worden ist, während die Toxinbildung in den im Autoklaven sterilisierten Nährböden eine geringere ist und mit länger andauernder Erwärmungszeit abnimmt. In den anderen Versuchen, wo die alkalische Reaktion erst nach der Sterilisation hergestellt worden ist, sehen wir das eigentümliche Verhalten, daß die Toxinbildung in der Bouillon am größten ist, welche 10 Minuten erhitzt worden ist, während sie sowohl in der tyndalisierten als in der länger erhitzten Bouillon schwächer bleibt.

Man bekommt durch diese Untersuchungen den Eindruck, *daß die Temperatur, bis auf welche die Bouillon erhitzt wird, ebenso wie die Erwärmungszeit und die Wasserstoffionenkonzentration Faktoren sind, die*

die Verwendbarkeit des Nährbodens zur Toxinbildung in hohem Grade beeinflussen.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen *Madsens* (siehe oben). Dieser Unterschied rührt vielleicht von den etwas verschiedenartigen Darstellungsweisen der Bouillons her oder — was vielleicht wahrscheinlicher ist — daher, daß in den älteren Untersuchungen keine ausreichende Messung (Austitrierung) des Toxins vorgenommen worden ist, was unzweifelhaft der Tatsache zugeschrieben werden muß, daß man damals (1896) kein so reiches Tiermaterial wie jetzt zur Verfügung hatte.

Diese durch starkes Erwärmen hervorgerufene Verschlechterung des Nährbodens beruht wohl großenteils auf der Bildung von wachstumshemmenden Körpern, welche beim Abbau der Proteinkörper entstehen; vielleicht kann auch der Vernichtung der in der Bouillon enthaltenen *Vitamine* eine gewisse Bedeutung beigemessen werden. Diese Annahme wird von einer soeben erschienenen Arbeit von *Jiménez*[33]) gestützt, in welcher festgestellt wird, daß die in Blut, Organen und Muskeln vorhandenen Vitamine einen fördernden Einfluß auf das Wachstum vieler pathogenen Mikroben ausüben.

e) Die Bedeutung verschiedener Metallsalze.

In meinen Untersuchungen über das Staphylolysin*) ist gezeigt worden, daß die Gegenwart verschiedener Metallsalze in der Kultur sehr oft einen durchgreifenden Einfluß auf die Toxinbildung ausübt.

Nach diesen Ergebnissen lag es nahe auch zu untersuchen, ob ähnliche Verhältnisse für die Bildung des Diphtherietoxins von Bedeutung seien. Derartige Versuche sind natürlich in gleichem Umfang wie die Versuche mit Staphylolysin nur schwerlich ausführbar, und ich habe vorläufig nur Gelegenheit gehabt den Einfluß des *Mangans* auf die Diphtherietoxinbildung zu untersuchen. Ich habe das Mangan für diese ersten Untersuchungen gewählt, teils weil dieses Metall als ein in vielen Fällen sehr kräftig wirkender Katalysator bekannt ist, teils weil es die Staphylolysinbildung stark fördert, und schließlich weil dieses Metall im tierischen Organismus die Diphtherieantitoxinbildung hochgradig stimuliert [*Walbum*[34])].

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß zu der nach dem gewöhnlichen Darstellungsmodus bereiteten sterilen Diphtheriebouillon erst die berechnete Menge calcinierter Soda und danach die angeführten Mengen $MnCl_2$ in 10 ccm Wasser gelöst hinzugefügt wurde. Die Manganlösung wurde in Reagensgläsern so abgemessen, daß der Inhalt eines solchen einem Kolben Bouillon à 700 ccm entsprach, und die Sterilisierung fand durch Erhitzen im Autoklaven statt. Für jede Probe wurden

*) Diese Zeitschr. **129**, 367. 1922.

wenigstens 4 Kolben verwendet, für einige der Versuche aber weit größere Quantitäten, bis 15 Kolben. Die Kulturen standen mehrere Tage (in den Tabellen sind die Zahlen angegeben) im Brutschranke und wurden nach dem Mischen filtriert.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle XIX zusammengestellt und in Abb. 12 graphisch dargestellt.

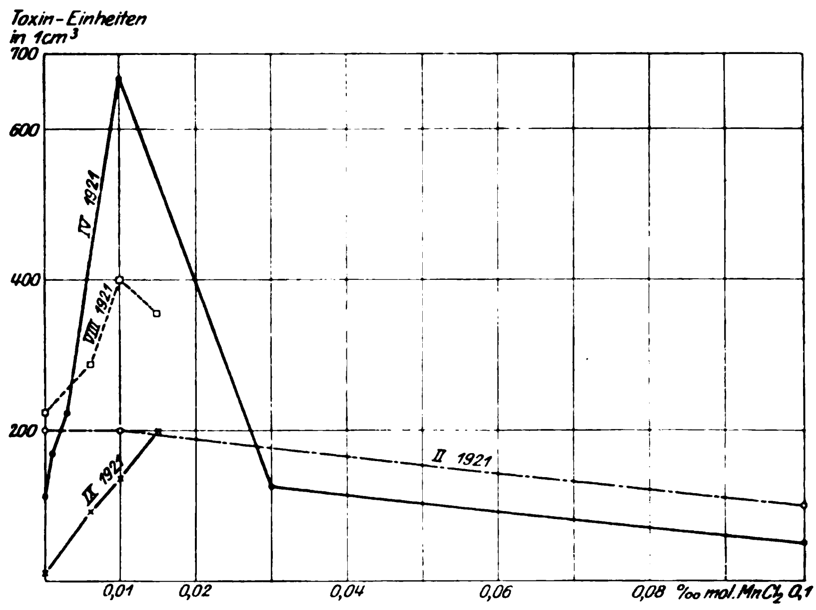


Abb. 12. Die Bedeutung des $MnCl_2$ für die Diphtherietoxinbildung.

Aus diesen Versuchen geht hervor, *daß ein Zusatz von derartigen minimalen Mengen Manganochlorid zum Nährboden in vielen Fällen einen sogar sehr stark fördernden Einfluß auf die Diphtherietoxinbildung ausüben kann.* Im Versuche 4 1921 wird durch Zutat von 0,01 molarer Lösung von $MnCl_2$ ein etwa 6 mal stärkeres Toxin als in den Kontrollkulturen ohne Manganzusatz erzielt. Die Versuche zeigen ferner, daß wahrscheinlich eine optimale Konzentration von Manganochlorid (um 0,01 molarer Lösung) vorhanden ist, so daß die Wirkung beiderseits abnimmt. Im Versuche 2 1921 hat der $MnCl_2$-Zusatz die Toxinbildung nicht gefördert, während jedoch die größeren Konzentrationen eine geringere Toxinproduktion zur Folge gehabt haben.

Diese wenigen Untersuchungen genügen natürlich keineswegs, um überzeugend zu wirken, sie zeigen aber anscheinend dasselbe wie die entsprechenden mit Staphylolysin angestellten Versuche, daß nämlich die Anwesenheit kleiner Quantitäten von Metallsalzen in vielen Fällen

Tabelle XIX.

Toxin Nr.	Tage im Thermostat	$\frac{mol}{1}$ $MnCl_2$ ‰	p_H im Toxin	Einheiten in ccm
II 1921	13	0	8,10	200
		0,01	8,30	200
		0,1	7,70	100
		0,5	7,73	10
VIII 1921	12	0	8,08	222
		0,006	7,80	286
		0,01	7,65	400
		0,015	8,15	357
IV 1921	11	0	8,20	111
		0,0001	8,20	143
		0,0003	8,20	154
		0,001	8,05	167
		0,003	8,00	222
		0,01	8,15	677
		0,03	7,75	125
		0,1	8,10	50
IX 1921	12	0	8,75	10
		0,006	8,30	91
		0,01	8,40	133
		0,015	8,40	200

einen außerordentlich großen Einfluß auf die Bildung der Toxine ausüben kann.

Zusammenfassung.

Bei der Beurteilung der durch diese Untersuchungen über die Bildung des Diphtherietoxins erzielten Resultate muß die Unsicherheit, mit welcher die Darstellung dieses Toxins in besonders hohem Grade behaftet ist, mitberücksichtigt werden. Diese anscheinende Willkürlichkeit ist sowohl in älteren als in neueren diesbezüglichen Arbeiten besprochen worden; besonders hat *Madsen* diesem Verhältnis größere Aufmerksamkeit gewidmet und erwähnt in seiner Arbeit[3]) die großen Schwierigkeiten, welche an die Aufgabe geknüpft ist, fortwährend große Quantitäten von starkem Diphtheriegift darstellen zu können. Die an verschiedenen Zeitpunkten und in verschiedenen Bouillonen dargestellten Kulturen ergaben nicht nur stark untereinander abweichende Resultate, was sich allenfalls noch erklären ließ, sondern es war sogar oft der Fall, daß Kulturen, die in jeder denkbaren Weise gleichartig behandelt worden waren und nebeneinander im Brutschranke sich entwickelt hatten, in ihrer toxischen Wirkung stark variierten, während einzelne sogar sehr giftig waren, ließen andere jede Giftigkeit vermissen.

Daß diese eigentümlichen Verhältnisse sich später nicht geändert haben, geht aus einigen in Tabelle XX zusammengestellten Versuchsergebnissen hervor. In den Jahren 1903—1908 war es wegen unserer

Tabelle XX.

Anzahl der Kolben	Sept. 1903	Januar 1904	Oktober 1904	Oktober 1904	Dez. 1904	Januar 1905	März 1905	Mai 1905	Februar 1906	Sept. 1907	Nov. 1907	Dez. 1907	Dez. 1907	Juni 1908	Nov. 1908
	16	19	18	2	19	22	4	8	4	25	18	5	6	2	2
Dosis in ccm	0,002	0,005	0,0075	0,005	0,01	0,005	0,01	0,007	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,005	0,01
† 1 Tag	—	—	—	—	—	—	—		—	1	—	—	—	—	
† 1½ Tage	—	3	—	—	—	—	—		2	10	18	5	—	—	
† 2 „	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—
† 2½ „	—	4	1	1	13	—	—	—	—	6	—	—	—	—	1
† 3 „	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
† 3½ „	—	5	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—
† 4 „	1	—	3	—	5	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—
lebt, große Infiltrat.	—	2	8	—	—	12	—	1 † 7 Tg. 1 † 9 „ 1 † 14 „	2		—	—	1	—	1
mittel	—	—	—	—	1	1	—	4	—	—	—	—	—	—	—
klein	—	2	2	1	—	3	—	—	—	—	—	—	3	—	—
ohne	14	3	3	—	—	5	3	—	—	8	—	—	—	1	—

Am Meerschw. auf 250 g geprüft.

experimentellen Arbeit mit Diphtherietoxin notwendig, starke Toxine darzustellen, weshalb wir oft die Toxizität jedes einzelnen Kolbens prüften, um dadurch die weniger toxischen oder völlig atoxischen Kulturen ausschalten zu können.

Die Tabelle XX spricht eine deutliche Sprache und bedarf keiner weiteren Kommentare.

Diese Schwankungen innerhalb desselben Präparates sind natürlich sehr nachteilig, wenn aber in Fällen wie die oben dargelegten in einigen Kolben starkes Toxin gebildet wird, ist es ja möglich durch Untersuchung jedes einzelnen Kolbens das starke Toxin für die praktische Verwendung zu sammeln und das schlechte auszuschalten. Obwohl dieses Vorgehen sehr umständlich ist und eine große Anzahl Meerschweinchen erfordert, ist man bei diesen Verhältnissen weit besser gestellt, als wenn die Toxinbildung in sämtlichen Kolben völlig versagt, was keineswegs selten stattfindet und zwar mitunter in Perioden von halb- oder ganzjähriger Dauer oder noch länger.

Es ist dann und wann die Anschauung geäußert worden (*Mc Conkey*), daß die Toxinbildung besonders an gewisse Jahreszeiten ge-

knüpft ist, in der Weise, daß man von einer Toxinsaison sprechen könne; ich habe im Laufe der Jahre meine Aufmerksamkeit auf diese Zusammenhänge gelenkt, jedoch ohne für die Bestätigung dieser Vermutung einen Anhaltspunkt zu finden.

Verhältnisse wie die oben erwähnten haben eine lebhafte Auswechslung von Diphtheriebacillenkulturen unter den verschiedenen Laboratorien der ganzen Welt mit sich gebracht; wenn ein Laboratorium sich in einer schlechten Periode befand, wurden andere Laboratorien, die keine Schwierigkeiten betreffs Toxinproduktion hatten, um Kulturen ihrer Bacillenstämme ersucht, in der Hoffnung, dadurch instand gesetzt zu werden, wieder starkes Toxin zu produzieren. Man darf jedoch behaupten, daß diese Auswechslung in der Regel ohne größere Bedeutung gewesen ist.

In dem Seruminstitut des dänischen Staates haben wir natürlich an denselben Schwierigkeiten wie andern Orts gelitten und haben sowohl in den guten als in den schlechten Toxinperioden fortwährend unsere Aufmerksamkeit auf diesen bedeutsamen Punkt der Serumdarstellung gelenkt. Wir haben z. B. durch Tierpassage versucht die Virulenz der Diphtheriebacillen zu steigern in der Hoffnung, die Toxinbildung gleichzeitig zu fördern; dies hat aber keine ermunternden Resultate ergeben. Wir haben ferner die verschiedenen zeitweise erschienenen Vorschläge zur Nährbodendarstellung durchprobiert, außerdem Bouillon aus Kalbfleisch, Rindfleisch und Pferdefleisch, ferner die verschiedenen käuflichen Peptonsorten (Witte, Chapoteaut, Berna, Parke, Davis & Co. u. a. m.) außer Pepton, welches wir selbst nach verschiedenen Methoden dargestellt haben. Als die nach der Methode von *Hida* dargestellte Bouillon, zu welcher man Klettenwurzeln verwendet, die mit dem Fleische zusammen gekocht werden, kein gutes Resultat ergab, verschafften wir uns Klettenwurzeln aus Japan; die mit diesen dargestellte Bouillon zeigte aber keine bessere Toxinbildung. Wir haben ebenfalls mit säuregespaltenem und mit unbehandeltem Inulin aus Dahlienknollen Versuche angestellt, aber ohne befriedigende Resultate.

Es hat sich indessen wiederholt gezeigt, daß die Toxinbildung am besten in Kalbsbouillon mit Pepton Witte vor sich geht, und nach meiner mehrjährigen Erfahrung führt die S. 33 angegebene Darstellungsweise für Bouillon häufiger als die übrigen zu befriedigenden Resultaten.

Die durch die vorliegenden Untersuchungen erhaltenen Resultate sind folgende:

Die Diphtheriebacillen *wachsen* zwischen ca. 20° und ca. 42° mit einem Optimum um 34°; sie können sich zwischen p_H = ca. 5,2 und p_H = ca. 8,90 entwickeln, und die optimale Wasserstoffionenkonzentration liegt in der Nähe von 7,0; wenn die Temperatur ungünstig wird,

scheint eine geringe Verschiebung dieses Optimums gegen die alkalische Seite hin stattzufinden.

Die *Hautbildung* in den Kulturen fängt am schnellsten in den Kulturen an, deren Anfangs-Wasserstoffionenkonzentration $p_{H^\cdot}$ = ca. 7,5 ist und erreicht auch in diesen am frühesten ihre volle Größe (ca. 3 Tage); in Kulturen mit einem niedrigeren $p_{H^\cdot}$ als ca. 6,8 erreichen die Häutchen nicht die volle Größe und werden mit zunehmender Acidität allmählich dünner, während die Hautbildung in den alkalischen Kulturen allmählich bis an die Wachstumsgrenze sich einstellt, hört sie in den sauren etwas früher auf (bei $p_{H^\cdot}$ = ca. 5,6) als die Wachstumsgrenze erreicht wird.

Das Temperaturoptimum der Hautbildung scheint bei ca. 36° zu liegen; sie nimmt am schnellsten mit ansteigender, langsamer mit fallender Temperatur ab.

Die Änderung des Aciditätsgrades der Kulturen während des Wachstums wurde durch Feststellung der Wasserstoffionenkonzentration an verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung verfolgt; es zeigt sich, daß diese Schwankungen in ihrem ganzen Verlauf dem Typus C *Sproncks* und dem alkalischen Typus *Madsens* entsprechen. Die Alkalescenz der Kultur steigt im Laufe von 20—25 Tagen bis $p_{H^\cdot}$ = 8,5—8,7.

Um die Bedeutung dieser Verhältnisse für die Toxinbildung in den Kulturen beurteilen zu können, war es notwendig einige Untersuchungen über die Abschwächung des Diphtherietoxins bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen zu unternehmen. Aus diesen Versuchen geht hervor, *daß das Diphtherietoxin völlig vernichtet wird (nach 6 Tagen bei 37°), wenn die Lösung saurer als* $p_{H^\cdot}$ *= ca. 5,5 und alkalischer als* $p_{H^\cdot}$ *= 9,3—10,0 ist. Die für die Erhaltung des Toxins optimale Wasserstoffionenkonzentration liegt nicht beim Neutralpunkte, sondern zwischen* $p_{H^\cdot}$ *= 7,2 und 7,6.*

Die Abschwächung, welche das Toxin bei $p_{H^\cdot}$ *= ca. 7,4 erleidet, ist sowohl für frisch dargestelltes als für längere Zeit aufgehobenes Toxin fast dieselbe.*

Es sind einzelne Versuche über die Bedeutung der Temperatur für diese Abschwächung bei 25°, 30°, 35° und 40° ausgeführt worden (Abb. 7).

Wie die älteren Untersuchungen von *Roux* und *Yersin*, *Spronck* und *Madsen* gezeigt haben, besteht zwischen der Anfangsreaktion der Kultur und der *Toxinbildung* ein gewisses Verhältnis.

Meine Untersuchungen haben in großen Zügen gezeigt, daß eine Kultur immer alkalisch wird (d. h. $p_{H^\cdot} > 7{,}0$*), wenn das Anfangs-*$p_{H^\cdot}$ *der Bouillon größer als ca. 7,20 ist, während die Kultur immer sauer wird (d. h.* $p_{H^\cdot} < 7{,}0$*), falls der Aciditätsgrad kleiner als* $p_{H^\cdot}$ *ca. 6,60 ist.*

Kulturen, deren Anfangs-$p_{H^\cdot}$ zwischen 6,60 und 7,20 liegt, können sich ebensowohl in die eine wie in die andere Richtung entwickeln.

Diese Zahlen bestätigen prinzipiell völlig die erwähnten früher gemachten Beobachtungen.

Ebenfalls wird die ältere Anschauung bestätigt, daß eine nennenswerte Toxinbildung nur in den alkalischen Kulturen stattfindet; doch habe ich Beispiele davon gehabt, daß in Kulturen mit einem $p_{H^{\cdot}} = 6{,}7$ bis 6,8 sogar beträchtliche Toxinmengen vorhanden sein können; in Kulturen mit $p_{H^{\cdot}} = 6{,}3$—6,5 finden sich in der Regel nur unbeträchtliche Toxinmengen, und in noch saueren Kulturen bleibt die Toxinbildung stets ganz aus.

Aus meinen Untersuchungen über die Bedeutung des Anfangs-$p_{H^{\cdot}}$ der Bouillon für die Toxinbildung darf gefolgert werden, *daß eine Reaktion, deren $p_{H^{\cdot}}$ kleiner als ca. 6,5 und größer als ca. 8,0 ist, gewöhnlich ungünstig sein wird, während innerhalb eines Intervalles von $p_{H^{\cdot}} = 6{,}8$ bis 7,7 die Toxinbildung fast gleichartig verläuft, weshalb ein $p_{H^{\cdot}} = 7{,}2$ bis 7,3 als Optimum angesehen werden darf.*

Es wurden einige Versuche ausgeführt, um die Bedeutung der Anfangs-Wasserstoffionenkonzentration für die Geschwindigkeit der Toxinbildung in den Kulturen zu untersuchen. Diese Versuche zeigen nicht nur betreffs der gebildeten Toxinmenge einen großen Unterschied, sondern auch bezüglich der Bildungsgeschwindigkeit. *Die Akmen der Kurven stellt sich in den Kulturen, deren Anfangsalkalinität am größten war, früher als in den weniger alkalischen (oder saueren) Kulturen ein.*

Diese Verschiebung des Optimums steht wahrscheinlich mit den Änderungen des $p_{H^{\cdot}}$ in den Kulturen in Verbindung (siehe Tabelle XII), indem die Alkalescenzkurve mit zunehmendem Anfangs-$p_{H^{\cdot}}$ schneller ansteigt und *die Toxinabschwächung mit der Alkalescenzsteigerung parallel geht.*

Wie von *Bunker* vorgeschlagen, ist es gewöhnlich am besten, um ein Abfallen der Toxinkurve zu vermeiden, das Wachstum zu unterbrechen, wenn das $p_{H^{\cdot}}$ der Kultur 8,00—8,20 erreicht hat; die Wasserstoffionenkonzentration ist jedoch nicht immer als der allein entscheidende Faktor für diese Verhältnisse zu betrachten (siehe Abb. 4 u. 5).

Das Temperaturoptimum der Toxinbildung liegt um 36°, also an demselben Punkte wie das Optimum der Hautbildung.

Versuche zur Beseitigung der großen Änderungen des $p_{H^{\cdot}}$ während des Wachstums mittels Phosphate und Glykokoll mißlangen.

Nach meinen mehrjährigen Erfahrungen ist *der für die Darstellung von Diphtherietoxin geeignetste Nährboden Kalbfleischbouillon mit Pepton*; eine vorausgehende Vergärung mittels Colikultur scheint, falls die Gärung bei einer nicht zu hohen Temperatur vor sich geht (etwa 20 Stunden bei 20—26°), einen guten Einfluß auszuüben; zur Bouillon wird 0,2% Invertzucker (oder Traubenzucker), 0,5% Chlornatrium und 1,5% Pepton Witte getan. Die Sterilisation im Autoklaven wird vor

der Alkalisierung der Bouillon bei ihrer normalen Wasserstoffionenkonzentration ($p_{H^\cdot}$ = ca. 6,2) unternommen, und erst danach durch Zusatz von sterilisierter calcinierter Soda (siehe S. 33) das gewünschte $p_{H^\cdot}$ eingestellt.

Meine Versuche über die Bedeutung der *Fleischkonzentration* zeigen, daß das Verhältnis 500 g Fleisch zu 1 Liter Bouillon (als 50% Fleisch bezeichnet) gut erwählt ist, da sowohl Wachstum als Toxinbildung in weniger konzentrierten Nährböden schwächer werden, während die Resultate in konzentrierteren Bouillons (75% und 100% Fleisch) scheinbar die gleiche wie in der Bouillon mit 50% Fleisch sind.

Die zweckmäßigste *Peptonkonzentration* scheint bei 1% und höher (1, 2 und 5% geben anscheinend dasselbe Resultat) zu liegen, während geringere Mengen (0,5% und 0,25%) bedeutend schlechteres Wachstum und geringere Toxinbildung ergeben.

Ein *Chlornatriumgehalt* bis ca. 2% scheint für die Toxinbildung belanglos, während 5% die Bildung von Toxin herabsetzt.

Meine Versuche über die Bedeutung des Erwärmens beim Sterilisieren zeigen, *daß die Temperatur, bis zu welcher die Bouillon erhitzt wird, ebenso wie die Erwärmungszeit und die Wasserstoffionenkonzentration Faktoren sind, die einen großen Einfluß auf die Verwendbarkeit des Nährbodens betreffs Toxinbildung ausüben.*

Ein Zusatz zum Nährboden von minimalen Mengen Manganochlorid (0,01 molarer Lösung von $MnCl_2$) kann in vielen Fällen einen sogar sehr beträchtlichen fördernden Einfluß auf die Diphtherietoxinbildung ausüben.

Der Vorgang der Toxinbildung in einer Diphtheriekultur läßt sich folgendermaßen vorstellen:

Sobald die Diphtheriebacillen sich zu entwickeln anfangen, beginnen zugleich die chemischen Änderungen im Nährboden; die vorhandenen vergärbaren Kohlenhydrate werden in saure Verbindungen umgebildet, wodurch die Wasserstoffionenkonzentration der Flüssigkeit gesteigert wird; danach — oder vielleicht gleichzeitig damit — werden während des Wachstums alkalische Produkte gebildet, was allmählich zu einer Herabsetzung der Wasserstoffionenkonzentration führt; falls größere Mengen vergärbarer Kohlenhydrate zugegen sind, wird der Aciditätsgrad bis zu einem gewissen Punkt zunehmen, das Wachstum hört dann schnell auf und die Mikroben sterben. Wenn die Menge der Kohlenhydrate verhältnismäßig klein gewesen ist, wird die Reaktion allmählich alkalisch und die Wachstumsbedingungen deshalb besonders gut; mit zunehmender Alkalinität werden die Bedingungen wieder allmählich schlechter und die Mikroben sterben.

Noch ist die Frage unentschieden, ob das Diphtherietoxin in fertigem Zustande von den Bacillen sezerniert wird (primäres Sekretionsprodukt) oder ob es ganz oder teilweise seine fertige Form extracellulär erreicht;

von dieser Frage abgesehen, darf wohl angenommen werden, daß die Bildung dieses Toxins (ebenso wie die Staphylolysinbildung), nachdem das Wachstum in Gang gekommen ist, schnell einsetzt. Die Ursache, weshalb man in den ersten Tagen nur verhältnismäßig geringe Toxinmengen in den Kulturen findet, ist wahrscheinlich darin gelegen, daß das Wachstum erst dann kräftig beginnt (d. h. mit einer Bildung von dicken Häutchen auf der Oberfläche der Flüssigkeit), wenn die Reaktion wieder alkalisch geworden ist, es kann aber natürlich auch anderen Ursachen zugeschrieben werden.

Während der ganzen Wachstumsperiode ist das gebildete Toxin einer Abschwächung ausgesetzt und die Geschwindigkeit dieser ist in hohem Grade von der in der Kultur an dem gegebenen Zeitpunkte vorhandenen Wasserstoffionenkonzentration und vielleicht außerdem von anderen Faktoren abhängig. Daß die sauren Kulturen atoxisch gefunden werden, rührt teils von einer geringen Giftbildung, teils von einer schnellen Vernichtung des gebildeten Toxins her. Selbst bei der für die Erhaltung des Toxins günstigsten Wasserstoffionenkonzentration (p_H = ca. 7,4) findet bei 37° eine Abschwächung statt. In den normal verlaufenden Kulturen, d. h. in denen, deren Alkalinität nach dem ersten geringen Fallen gleichmäßig zunimmt, ist das produzierte Toxin natürlich einer immer schneller verlaufenden Abschwächung ausgesetzt, je stärker alkalisch die Kulturen werden.

Die Toxinmengen, welche somit bei den Messungen in einer Diphtheriekultur gefunden werden, sind deshalb nur ein Teil — und oft sicher nur ein kleinerer Teil — des während der ganzen Wachstumsperiode gebildeten Toxins.

Bei der Darstellung derartiger Toxine müssen alle wachstumsfördernden Faktoren möglichst viel vermehrt werden, während die toxinvernichtenden in so hohem Grade wie möglich gehemmt werden müssen, jedoch ohne gleichzeitig das Wachstum zu schädigen. Der bedeutsamste Faktor ist in dieser Verbindung wahrscheinlich die Alkalinität der Flüssigkeit, und es ist keineswegs ausgeschlossen, daß, falls diese in der Nähe der für die Erhaltung des Toxins optimalen Wasserstoffionenkonzentration gehalten wird, die Abschwächung des gebildeten Toxins wesentlich beschränkt werden würde, und dadurch stärkere Toxinlösungen zu erzielen sind. Indessen ist dies schwierig zu bewerkstelligen. So scheint es mittels Puffer unerreichbar, und durch Regulierung der Wasserstoffionenkonzentration mittels oftmaliger Zusätze von kleineren Säuremengen wird das Wachstum der Kulturen in hohem Grade gestört, was kaum als zweckentsprechend angesehen werden kann.

Die bei der Toxinbildung in Frage kommenden Verhältnisse sind natürlich keineswegs so einfache wie hier skizziert worden ist; es scheint

aber unzweifelhaft zu sein, daß die Wasserstoffionenkonzentration der Kultur eine der bedeutsamsten Faktoren für die Bildung und Erhaltung des Toxins ist.

In den vorliegenden Untersuchungen habe ich besonderes Gewicht auf die Untersuchung der Bedeutung der wichtigeren und naheliegenden Faktoren, welche die Bildung des Diphtherietoxins beeinflussen, gelegt; es hat sich gezeigt, daß die Wasserstoffionenkonzentration des Nährbodens, die Züchtungstemperatur, die Züchtungszeit, die Konzentration der Fleischextraktivstoffe, Pepton, Salz und die Sterilisation Faktoren sind, welche eine größere oder kleinere Rolle dabei spielen, und es unterliegt keinem Zweifel, daß man durch Einstellen der Versuchsbedingungen in den optimalen Zonen instand gesetzt wird, die ganze Toxindarstellung in sicherere Bahnen zu leiten. Es ist aber keineswegs zu leugnen, daß wir noch weit davon entfernt sind, die bei der Bildung des Diphtherietoxins sich abspielenden Prozesse völlig zu beherrschen.

Indessen halte ich es für sicher, daß die vorläufig völlig unbekannten Faktoren, welche trotz aller Sorgfältigkeit in Darstellung und Behandlung des Nährbodens enorme Schwankungen in der Toxinbildung verursachen können in bezug auf die Stoffmenge klein sein müssen.

Man kann sich nur schwer von dem Gedanken befreien, daß unter den Faktoren, welche hier eine Rolle spielen, die von der Glaswand abgegebenen Stoffe keineswegs belanglos sind. Der Gedanke, daß es die von den Glaswänden abgegebenen Alkalimengen sein sollen, welche durch Änderung der Wasserstoffionenkonzentration jene Schwankungen bewirken, ist absolut unwahrscheinlich. Teils sind die hier in Frage kommenden Alkalimengen so klein, daß sie kaum in einer pufferreichen Flüssigkeit wie Pepton-Bouillon Änderungen in der Wasserstoffionenkonzentration herbeizuführen vermögen, und falls sie solche hervorrufen könnten, würden diese so unbeträchtliche sein, daß sie kaum einen wesentlichen Einfluß auf die gebildete Toxinmenge ausüben würden.

Madsen hat in seinen Untersuchungen auch die Aufmerksamkeit auf einen eventuellen Einfluß seitens der Glaswände in dieser Beziehung gelenkt, und hat sogar die Kolben bezeichnet, in welchen die Entwicklung von der in den übrigen abwich, hat aber durch wiederholte Verwendung nicht gefunden, daß eben an diese Kolben etwas Außergewöhnliches klebte.

Nachdem ich durch meine Versuche über die Bedeutung verschiedener Metallsalze für Lysin- und Toxinbildung gezeigt habe, daß das Vorhandensein von ganz außerordentlich kleinen Mengen dieser Stoffe oft eine beträchtliche, entweder hemmende oder fördernde Einwirkung auf den Verlauf der Toxinbildung ausüben können, neige ich immer mehr zu der Anschauung, daß die Schwankungen, welche oft in der

Toxinkonzentration der verschiedenen Kolben sich einstellen, vielleicht großenteils der Wirkung kleiner Mengen von verschiedenen Metallverbindungen zugeschrieben werden könne, welche während des Aufenthalts im Autoklaven und vielleicht zugleich während des Wachstums von den Glaswänden der verwendeten Züchtungsgefäße abgegeben werden.

Literatur.

[1]) *Davis, Lewis*, Journ. of Bact. Vol.. V. 1920. — [2]) *Spronck*, Ann. de l'Inst. Pasteur. 1895. — [3]) *Madsen, Th.*, Disp. 1896. Zeitschr. f. Hyg. **26**. — [4]) *v. Gröer* und *Srnka*, Zentralbl. f. Bioch. **82**. 1918. — [5]) *Bunker, W. M.*, Journ. of Bakt. Vol. IV. 1919. — [6]) *Dernby, K. G.*, Ann. de l'Inst. Pasteur **35**. 1921. — [7]) *Roux* und *Yersin*, Ann. de l'Inst. Pasteur 1888 u. 1889. — [8]) *Escherich*, Äthiol. u. Pathogenese d. epid. Diphth. 1894. — [9]) *Fibiger*, Bakt. Studier over Difteri. 1895. — [10]) *Nicolle*, Ann. de l'Inst. Pasteur 1896. — [11]) *Arrhenius* und *Madsen*, Acad. Royal des Scienc. et des Lettres des Danemark 1904. — [12]) *Madsen, Th.*, Zeitschr. f. Hyg. **32**. 1899; *Kraus* und *Levaditi*, Handb. d. Techn. u. Method. der Immunitätsforsch. **1**. 1907. — [13]) *Davis, Lewis*, J. Lab. a. Klin. med. **3**. 1918. — [14]) *Park* und *Williams*, J. of exp. Med. **1**. 1896. — [15]) *Guinochet*, C. R. 1892. — [16]) *Ushinsky*, Zentralbl. f. B. **14**. 1893. **31**. 1897. — [17]) *Fränkel*, Hyg. Rundschau 1894. — [18]) *Hougounnencq* und *Doyen*, Soc. de biol. 1896. — [19]) *Hadley*, J. of inf. Dis. Supl. **3**, 95. — [20]) *Davis, Lewis* und *Newell S. Ferry*, J. of Bact. Vol. IV. 1919. — [21]) *Smith, Theobald*, J. of exp. Med. **4**. 1899. — [22]) *Berry, Jane L.*, Coll. Stud. fr. the Bureau of Lab. New York. **8**. 1914/15. — [23]) *Martin*, Ann. de l'inst. Pasteur. **12**. 1898. — [24]) *Aronson*, Berl. klin. Wochenschr. 1894. — [25]) *Zinno*, Zentralbl. f. Bakteriol. **31**. 1902. — [26]) *Smirnow*, Berl. klin. Wochenschr. 1895. — [27]) *Martin*, Ann. de l'Inst. Pasteur. 1896. — [28]) *Spronck*, Ann. de l'Inst Pasteur. 1898. — [29]) *v. Dungern*, Zentralbl f. Bakteriol. **19**. 1896. — [30]) *Cartwright Wood*, Zentralbl. f. Bakteriol. **20**. 1896. — [31]) *Hida, O.*, Zentralbl. f. Bakteriol. **53**. — [32]) *Robinson* und *Meader*, Journ. of inf. dis. **27**. 1920. — [33]) *Jiménez, D. Jésus*, Siglo méd. 68. (spanisch) ref. in Ber. üb. die ges. Physiol. **8**, 324. 1921. — [34]) *Walbum, L. E.*, Kgl. d. Vid. Selsk. Biol. Medd. III. 6. 1921; Comptes rend. d. séances de la Soc. de Biol. **80**. 1921.

Die Entstehung elektrischer Ströme in lebenden Geweben.

Eine Erwiderung an die gleichbetitelte Arbeit von *R. Beutner* [1]).

Von

H. Rohonyi (Budapest).

(Eingegangen am 28. Februar 1922.)

Im Jahre 1914 habe ich in dieser Zeitschrift meine experimentellen Untersuchungen und eine darauf begründete Theorie bez. der Entstehung der bioelektrischen Ströme beschrieben[2]). Meine Erhebungen wurden in der unlängst erschienenen trefflichen Arbeit *R. Beutners* zum Teil ausführlich diskutiert. Die Kritik des Autors kann etwa folgendermaßen kurz zusammengefaßt werden. Es ist seiner Ansicht nach noch zweifelhaft, ob alle elektromotorischen Eigenschaften der Niederschlagsmembrane sich mit einer Wasserschicht nachahmen lassen, wie das von mir behauptet wurde. In dieser Hinsicht müßte — nach *Beutner* — eine weitere experimentelle Aufklärung angestrebt werden. Meine z. T. auf diese Nachahmungsmöglichkeit begründete Theorie des bioelektrischen Potentials wurde dann von *Beutner* als eine widerspruchsvolle Theorie glatt zurückgewiesen.

Da ich aus den Ausführungen *Beutners* deutlich ersehe, daß er meine Behauptungen teils nicht richtig gewürdigt, z. T. aber gänzlich mißverstanden hat, erachte ich es als nicht überflüssig, auf meine Resultate nochmals hinzuweisen, um so mehr, da ich durch das Lesen der Arbeit *Beutners* noch gestärkt wurde in meiner Überzeugung, daß meine Auffassung richtig und zum weiteren Studium der bezüglichen Probleme ausschlaggebend sei.

I.

In meiner Abhandlung „Ionenpermeabilität und Membranpotential" habe ich die Quelle der Kraft (EMK) der Kupferferrocyanmembran zum Studium gemacht. Wie bekannt, gibt das System:

$$- \; CuSO_4\text{-Lösung} \mid \text{Kupferferrocyanmembran} \mid K_4FeCy_6\text{-Lösung} \; +,$$

---

[1]) 1920. Ferd. Enke, Stuttgart.

[2]) Ionenpermeabilität und Membranpotential, diese Zeitschr. **66**, 232; Zur Theorie der bioelektr. Ströme, diese Zeitschr. **66**, 248.

verbunden mittels Normal-Chlorkalium-Kalomel-Elektroden mit einem Galvanometer, ein Potential von etwa 0,10 Volt, wobei sich die Kupferlösung negativ, die Ferrocyanlösung positiv erweist. Die Größe und Richtung der EMK dieses Systems ist von der Konzentration der Kupfer- und Ferrocyanlösungen weitgehend unabhängig, ändert sich aber wesentlich, wenn der Chlorkaliumgehalt der ableitenden Kalomelelektrode verändert wird, und zwar vermindert sich die EMK der Kette, wenn der ClK-Gehalt der Kalomelelektrode verringert wird. Den Ursprung der EMK der Membrankette betreffend waren für mich folgende Versuche ausschlaggebend. Wird an Stelle der Membran in der Kette reines (destilliertes) Wasser gefügt, hat also die Kette folgende Zusammensetzung:

$$— CuSO_4\text{-Lösung} \mid \text{reines Wasser} \mid K_4FeCy_6\text{-Lösung} +,$$

dann wird *eine EMK, von derselben Richtung und Größe gemessen, wie mit der Membrankette.* Auch ist diese Wasserkette in dem Maße unabhängig von den Konzentrationen der Kupfer- und Ferrocyanlösungen, und in derselben Weise abhängig vom KCl-Gehalt der ableitenden Elektroden, wie das bei der Membrankette der Fall ist. [Diese Erscheinung, die von *Beutner* auch bei physiologischen Objekten (Apfel, Froschmuskel usw.) und bei seinen Salicylaldehydketten beobachtet wurde, wird von *Beutner* als „der Konzentrationseffekt", KE., bezeichnet.] Ich habe betont, daß die ähnliche Rolle der Membran und des reinen Wassers in diesen Ketten keineswegs der Ausdruck einer oberflächlichen Analogie ist, vielmehr dadurch verursacht wird, daß 1. die Membran für die Kupfer- und Ferrocyansalze impermeabel ist, d. h. sie enthält diese Salze ebensowenig, wie das reine Wasser; 2. daß die Membran wasserhältig und wasserdurchlässig ist, d. h. sie besteht im wesentlichen aus Wasser. Als Bestätigung dieser Behauptungen habe ich auf die Leitfähigkeitsmessungen von *Berkeley* und *Hartley* verwiesen, wonach die elektrische Leitfähigkeit der Kupferferrocyanmembran etwa $3 \cdot 10^{-6}$ rec. Ohm/cm beträgt, demnach mit der des (gewöhnlichen) destillierten Wassers gut übereinstimmt. Nachdem ich dann ähnliche Versuche auch mit der semipermeablen Membran bestehend aus Gerbsäuregelatine, beschrieben habe, habe ich folgenden Satz aufgestellt: „*Die EMK der Niederschlagsmembrane ist eine Diffusions-EMK*, welche auf Grund der bez. *Planck*schen Formel $\pi_1 - \pi_2 = RT \ln \xi$ und $\frac{\xi u_2 c_2 - u_1 c_1}{v_2 c_2 - \xi v_1 c_1}$ usw. zu berechnen ist; *die Membrane haben in diesen Ketten die Bedeutung eines elektrolytfreien wässerigen Mediums.*"

Nach *Beutner*, der sich mit den Niederschlagsmembranen in einem besonderen Kapitel seines Buches beschäftigt, gilt für die theoretische Erklärung des „Konzentrationseffektes" dieser Membranketten das gleiche

wie für die Salicylaldehydketten. Er findet, daß die Kupferferrocyanmembran sich wie eine in bezug auf Alkalikationen reversible Elektrode verhält. Er schreibt ferner: „Man geht wohl nicht fehl, wenn man gemäß der Vorstellungen, die sich aus der Phasengrenztheorie ergeben haben, den elektromotorischen Konzentrationseffekt dadurch erklärt, daß Alkalisalz in chemischer Bindung in der Membran enthalten ist. Die Substanz der Membran ist nicht chemisch reines Cu_2FeCy_6, sondern enthält noch Alkalisalz gebunden, möglicherweise eine komplexe Kupferalkaliverbindung. Diese Folgerung deckt sich mit der in der analytischen Chemie bekannten Tatsache, daß der Kupferferrocyanidniederschlag stets Alkalisalze mit enthält. (Andere amorphe Niederschläge nehmen bekanntlich auch lösliche Salze mit auf.) Man erklärt dies bisweilen durch mechanische Einflüsse oder durch Adsorption, ohne bestimmte Beweise hierfür zu haben. Es können ebensowohl chemische Einflüsse dabei im Spiele sein" (S. 116).

Es ist nun eine leichte Aufgabe, nachzuweisen, daß alle die Erscheinungen, welche von mir und jetzt von *Beutner* als für diese Membrane charakteristisch beschrieben wurden, sehr einfach und rationell durch den von mir aufgestellten Satz (siehe oben) erklärt werden können, ohne daß wir gezwungen wären, irgendwelche unbewiesene Hypothesen gleich jener, daß Alkalisalze in der Membran in chemischer Bindung enthalten seien, aufzustellen.

Betrachten wir die Membranerscheinungen einzeln:

1. Die EMK der Kette $CuSO_4$-Lösung | Cu_2FeCy_6-Membran | K_4FeCy_6-Lösung ist von den Konzentrationen der Kupfer- und Ferrocyanlösungen weitgehend unabhängig.

Diese Eigenschaft der Kette kann aus der auf das Diffusionspotential bezüglichen *Planck*schen Formel direkt abgeleitet werden.

2. Die Tatsache, daß die EMK der Kette gleich etwa 0,10 Volt beträgt, wobei sich die Kupferlösung positiv erweist.

Es zeigt die folgende Kette $CuSO_4$-Lösung reines Wasser K_4FeCy_6-Lösung eine EMK von derselben Richtung und Größe.

3. Wird zur Kupferlösung ein Alkalisalz gegeben, so vermindert sich die EMK der Kette, wird das Alkalisalz entfernt, so ergibt sich wieder die ursprüngliche EMK (Reversibilität der Kette für Kationen, *Beutner*).

Erklärung: Jedes Diffusionspotential wird durch Hinzugabe von Alkalisalzen, wie längst bekannt, stark vermindert. Überall, wo man das Diffusionspotential ausschalten will, werden zu diesem Zwecke konzentrierte Alkalisalzlösungen verwendet.

4. *Beutner* beschreibt folgende Erscheinung: Wird die Kupfersulfatlösung, in welche die mit 10proz. warmer Gelatinelösung vermischte und nachher erstarrte Ferrocyanlösung eingetaucht wurde, nachher

umgerührt oder geschüttelt, so beobachtet man einen deutlichen Anstieg der EMK.

Erklärung: Durch die membranbildende Reaktion entsteht ein Alkalisalz, K_2SO_4, das zunächst in der Grenzschicht von Lösung und Membran aufgehäuft wird. Durch das Vorhandensein dieses Alkalisalzes wird aber das Diffusionspotential der Kette etwas herabgedrückt. Wird nun die Konzentration des Alkalisalzes dank der durch das Umschütteln beschleunigten Diffusion des Salzes in der Grenzschicht vermindert, dann muß die EMK der Kette steigen.

5. Wird die Membran in umgekehrter Folge aufgebaut, indem wir die Kupferlösung gelatinieren und in die Röhre füllen, das Becherglas hingegen mit Ferrocyanlösung füllen, dann wird überhaupt keine EMK erzeugt.

Die Erklärung *Beutners*, daß infolge der Gelatinierung alle Konvektionsbewegungen unterbunden werden, gilt natürlicherweise auch im Sinne der Diffusionstheorie.

6. Nicht nur durch Konzentrationsänderungen desselben Salzes ändert sich die EMK an der Membran, sondern auch durch Wechseln des Salzes bei gleichbleibender Konzentration. Z. B. ergibt die Kette + $^1/_{40}$ Mol NaCl | Membran | $^1/_{40}$ Mol KCl — eine EMK von 0,010 Volt, die Kette + $^1/_{40}$ Mol NaCl | Membran | $^1/_{40}$ Mol HCl — eine EMK von 0,033 Volt usw. usw. (*Beutner*).

Erklärung: Richtung, Größe und Reihenfolge der Kationen entsprechen *vollständig* den Erwartungen gemäß der Diffusionstheorie.

Es ist nach alldem gar nicht zweifelhaft, ob sich alle elektromotorischen Eigenschaften der Niederschlagsmembrane mit einer Wasserschicht nachahmen lassen, es ist im Gegenteil einleuchtend, daß alle diese Erscheinungen völlig den Forderungen der Diffusionstheorie gehorchen. Eine weitere experimentelle Aufklärung, die *Beutner* von mir verlangt, ist meiner Ansicht nach ganz unnötig, da speziell durch *Beutners* Untersuchungen die Diffusionstheorie der Niederschlagsmembrane — wenn auch unabsichtlich — die vielleicht noch fehlenden Stützpunkte gewonnen hat.

II.

In meiner Abhandlung „Zur Theorie der bioelektrischen Ströme" habe ich näher nachgeprüft, ob und inwieweit der Konzentrationseffekt mit wasserlöslichen Stoffen *ohne Membran* nachgeahmt werden kann. Ich habe gefunden, daß a) Ketten von folgender Zusammensetzung: wässerige Elektrolytlösung (I) | reines Wasser (II) einen KE zeigen, d. h. ihre EMK gesetzmäßig ändern, wenn an der Stelle des reinen Wassers verschiedenkonzentrierte Lösungen irgendeines Alkalisalzes verwendet werden; b) daß die Größenordnung des KE dieser Ketten

von der Natur des Elektrolyts in der Lösung I abhängt, und zwar ist der KE größer, wenn die Differenz der Wanderungsgeschwindigkeiten des Kations und Anions dieses Elektrolyts größer gewählt wird; c) daß der KE im Gebiete der kleinen Konzentrationen des Alkalisalzes in der Lösung II größer als im Gebiete stärkerer Salzkonzentrationen dortselbst ausfällt.

Nun entgegnet *Beutner*, daß es mir doch nicht gelungen ist, mit rein wässerigen Lösungen einen KE so zu reproduzieren, wie ihn das Gewebe zeigt, da ich, nach seiner Ansicht, wichtige Eigenschaften des Gewebes ganz außer Betracht gelassen habe.

Erstens wäre die Größenordnung des KE der wässerigen Ketten nicht hinreichend, um mit dem von Pflanzenteilen verglichen zu werden. Dann hat es „nur Salzsäure in beträchtlicher Konzentration, wie *Rohonyi* sie anwendet, einen beinahe so hohen KE wie Gewebe hervorgerufen; aber gerade eine freie starke Säure nimmt in elektrischer Hinsicht eine Sonderstellung ein wegen der stark unterschiedlichen Beweglichkeit ihrer positiven und negativen Ionen. In Geweben kommen freie Säuren in so hoher Konzentration nicht vor" (S. 146).

Ich bemerke hierzu Folgendes: Der von mir an wässerigen Ketten beobachtete KE ist tatsächlich geringer, als der an gewissen pflanzlichen Objekten von *Beutner* gefundene; er entspricht etwa der Hälfte des letzteren. *Beutner* findet aber selbst, daß viele lebende Objekte, und darunter speziell die tierischen keinen größeren KE zeigen als meine rein wässerigen Ketten. Es entspricht ferner nicht der Tatsache, daß nur die beträchtliche Mengen Salzsäure enthaltenden Ketten einen den biologischen annähernden KE zeigten, vielmehr erhellt aus meinen Daten, daß auch Milchsäure einen nicht geringeren KE produziert. Dabei enthielten diese Ketten die Milchsäure in Form einer 1,5proz. Lösung, während doch die Ölmodelle *Beutners* 10% Ölsäure (gelöst in Guajacol usw.) enthielten. Wie ich schon hervorhob, ergeben die Diffusionsketten, der Theorie gemäß, eine größere EMK und KE, wenn sich die Differenz der Beweglichkeiten des Kations und Anions größer erweist. Wir finden demgemäß die größten EMK und KE an Ketten, die Säure enthalten. Verwenden wir verschiedene Säuren nacheinander, dann müssen wir finden, daß die organischen Säuren größere KE produzieren als anorganische, und unter den organischen werden wiederum diejenigen mit kleinerem Molekulargewicht von denen mit größerem Molekulargewicht im allgemeinen in dieser Hinsicht übertroffen. Dies entspricht dem Gesetze, daß die Beweglichkeit dieser organischen Anionen mit dem Wachsen des Molekulargewichts — bis zu einer Grenze — stetig abnimmt; es wird demnach die Differenz (Beweglichkeit des Hydrogenions minus Beweglichkeit des Anions) mit dem Wachsen des Moleküls des letzteren immer größer. Hätte ich also statt Milch-

säure andere organische Säuren mit größerem Molekulargewicht gewählt, so hätte ich die Größe des biologischen KE mit rein wässerigen Ketten offenbar genauer reproduzieren können. Ganz so hohe Werte wie bei pflanzlichen Objekten hätte ich aber wahrscheinlich auch dann nicht erreicht, und zwar aus einerUrsache, auf die ich im nächsten Punkt eingehen werde.

Zweitens hebt *Beutner* die mangelhafte Konstanz der EMK bei den wässerigen Ketten vor. Das Sinken der Kraft der wässerigen Ketten soll eben „den entscheidenden Unterschied" gegenüber dem, was man z. B. bei Pflanzenteilen beobachtet, kennzeichnen. Ferner vermochte ich nach *Beutner* auch die Reversibilität der EMK, eine gemeinsame Eigenschaft der pflanzlichen Cuticula und der Ölketten, mit wässerigen Ketten nicht nachzuahmen.

Meine Bemerkung hierzu ist Folgendes: Es ist wahr, daß im Gegensatz zu dem konstanten Wert der EMK. einer Apfelschale, die EMK. meiner wässerigen Ketten nach ihrer Zusammenstellung stetig abnimmt. Dies wird durch die gegenseitige Diffusion der sich unmittelbar berührenden Lösungen verursacht, wie ich das schon damals hervorhob. Es ist dies dieselbe Erscheinung, die *Beutner* als einen störenden Faktor bei der Kupferferrocyanmembran beschreibt: die Konvektion, wodurch *auch das Membranpotential* gewissermaßen inkonstant gemacht wird (S. 4, Punkt 4). Naturgemäß wirkt dieser Einfluß noch viel störender auf rein wässerige Ketten ein, bei denen weder eine Membran noch irgendwelche fixierende Substanzen (Gelatine) die gegenseitige Diffusion einschränken. Könnte man mittels einer geeigneten *technischen* Einrichtung dafür sorgen, daß die gegenseitige Diffusion unmöglich gemacht und dadurch die Steilheit der ursprünglichen Konzentrationsgefälle in den angrenzenden Lösungen aufrechterhalten werde, dann müßten auch die rein wässerigen Ketten dieselbe Konstanz und Reversibilität wie physiologische Objekte aufweisen. Dann müßte auch die Größenordnung der EMK und des KE dieser wässerigen Ketten höher ausfallen, eine Erklärung, mit der ich oben (S. 7) noch schuldig geblieben bin. *Nach meiner Auffassung stellen eben die Niederschlagsmembrane und die biologischen Plasmahäute diese technische Einrichtung dar, wodurch ein Konzentrationsausgleich der angrenzenden Lösungen mehr oder weniger vollständig verhindert wird.* Das Vorhandensein dieser technischen Einrichtung in den Membran- und bioelektrischen Ketten ergibt natürlich die Berechtigung diese Systeme von den rein wässerigen Ketten *praktisch* gewissermaßen auseinanderzuhalten, darf aber die Kenntnis, daß es sich hier wie dort um dieselbe Erscheinung — das Diffusionspotential in wässerigen Ketten — handelt, nicht verschleiern.

III.

Auf die Frage, was für Folgerungen aus all dem auf die physikalisch-chemische Struktur der pflanzlichen und tierischen Plasmahaut zu machen sind, habe ich mich in meiner Abhandlung „Zur Entstehung der bioelektrischen Ströme“ etwa folgenderweise geäußert: *Wir können annehmen, daß die Plasmahaut ein den Niederschlagsmembranen ähnliches wässeriges Medium ist, welches für Wasser in hohem Maße, für Elektrolyte kaum permeabel ist, und eine organische säureartige Substanz, aber keine anderen Elektrolyte enthält.* Die Plasmahaut dürfte zwar auch lipoide Substanzen enthalten, kann aber in ihrem größten Teile nicht aus Lipoiden bestehen, sondern stellt im wesentlichen ein viel Wasser enthaltendes, eiweißartiges Gel dar, etwa wie die Gerbsäuregelatinemembran.

Ich muß mit Bedauern feststellen, daß diese Sätze von *Beutner* völlig mißverstanden wurden. Dieses Mißverständnis konnte nur dadurch zustande kommen, daß der Begriff des „Lipoids“ von *Beutner* anders als es üblich definiert wird. Wir verstehen in der Biochemie unter Lipoiden Substanzen, die in Fetten oder in den Lösungsmitteln der Fette löslich sind. *Beutner* bezeichnet hingegen als „Lipoide“ *alle* Substanzen, die mit Wasser bzw. mit wässerigen Lösungen nicht mischbar sind. Auf Grund dieser eigenartigen Definition findet natürlich *Beutner* zwischen meinen Behauptungen: die Plasmahaut ist nicht lipoid (1), die Plasmahaut nimmt keine Elektrolyte aus der wässerigen Umgebung auf (2), einen unüberwindlichen Widerspruch. Diesen vermeintlichen Widerspruch hätte er aber nicht gefunden, wenn er die Bezeichnung „Lipoid“ in dem allgemein üblichen Sinn verwendet hätte.

Meine oben formulierte Betrachtung über die Eigenschaften der Plasmahaut ist demnach theoretisch ebenso möglich und einwandfrei wie die Annahme *Beutners*, wonach die Plasmahaut aus einer lipoiden Substanz besteht, welche eine wasserunlösliche Säure enthält, die mit den Alkalisalzen der Gewebsflüssigkeit in bestimmter Weise chemisch reagiert. Welche von den beiden *möglichen* Annahmen in der Natur *tatsächlich* verkörpert wird, ist eine Frage, die meiner Ansicht nach aus dem elektromotorischen Verhalten der Gewebe allein nicht abgeleitet werden kann. In dieser Hinsicht verdient die Tatsache, daß meine Betrachtung, die aus dem elektromotorischen Verhalten der Plasmahaut entnommen wurde, in vollem Einklang mit anderen, ganz unabhängigen und gänzlich verschiedenen Eigenschaften der Plasmahaut: mit ihren *osmotischen* Eigenschaften, ist, ein besonderes Interesse. *Eine Plasmahautstruktur, wie ich sie vorstelle, muß naturgemäß diejenigen osmotischen Erscheinungen verursachen, die an den Gewebszellen tatsächlich beobachtet werden.* Wäre die Plasmahaut aus wasserundurchlässigem Lipoid gebildet, so könnten die gutbekannten bioosmotischen Erscheinungen nicht zustande kommen.

Hingegen stellen die Wirkungen der Narkotica und andere ähnliche Erscheinungen, die früher dem lipoiden Charakter der Plasmahaut zugeschrieben wurden, wie nun bekannt, allgemeine Erscheinungen der kleinen Gebilden mit großer Oberfläche dar, mögen diese Oberflächen aus Substanzen irgendwelcher Art bestehen.

Zusammenfassung.

Nach Überlegung der Ergebnisse von *Beutner* und nach Vergleichen mit meinen Befunden halte ich weiter daran fest, daß die richtigen Modelle für die bioelektrischen Erscheinungen nicht in den Ölsystemen *Beutners*, sondern in den Niederschlagsmembranen zu suchen sind. Demgemäß behalten die Folgerungen, die ich aus meinen Modellen betreffs der Struktur und Eigenschaften der physiologischen Plasmahaut gezogen habe, ihre Richtigkeit. Ich bin überzeugt, daß das weitere Studium der Niederschlagsmembrane, speziell der Gerbsäure-Eiweißmembran, unter den von mir im Jahre 1914 angegebenen Gesichtspunkten es ist, welches zur endgültigen Lösung des bioelektrischen Problems berufen ist.

Zur Frage der asymmetrischen Synthese.

Von

J. Pirak.

(Institut für organische, Agrikultur- und Nahrungsmittel-Chemie an der deutschen technischen Hochschule in Brünn.)

(Eingegangen am 1. März 1922.)

Mit 1 Abbildung im Text.

E. Fischer[1]) und *Markwald*[2]) haben die Methoden der Darstellung asymmetrischer Verbindungen als „synthetische" und „analytische" bezeichnet, d. h. als solche, die nur die Darstellung der d- oder l-Form einer optisch aktiven Substanz auf synthetischem Wege anstreben, und solche, die aus Racemkörpern durch Zersetzung oder Veränderung einer Komponente die andere isolieren, oder im Überschuß erhalten wollen.

Verschiedene Forscher versuchten die Bildung asymmetrischer Verbindungen durch Anwendung physikalischer Bewirkungen zu erzielen. Insbesondere wurde hierbei die Wirkung des magnetischen Feldes, oder die des zirkularpolarisierten Lichtes in Betracht gezogen. *Pasteur* verwendete starke Elektromagnete, ebenso versuchte *Boyd*[3]) Synthesen im magnetischen Felde, *J. Meyer* arbeitete mit einem durch ein Magnetfeld gelenkten, polarisierten Lichtstrahle. Alle diese Versuche lieferten jedoch Racemkörper. *Pasteur* sah daher die Bildung optisch aktiver Substanzen als besondere Eigenschaft des Lebens an. Was die Wirkung des zirkular polarisierten Lichtes anbetrifft, hat schon *van't Hoff*[4]) auf die Möglichkeit seines Einflusses hingewiesen. Die Sache gewann jedoch erst an Wahrscheinlichkeit, als *Cotton* nachwies, daß Strahlen zirkular polarisierten Lichtes von opt. akt. gefärbten Flüssigkeiten, es handelte sich um Lösungen komplexer Tartrate, je nach deren Drehungsrichtung, verschieden stark absorbiert werden[5]). Seine Versuche traubensaures Kupferalkali durch zirk. pol. Licht ungleich stark anzugreifen, hatten nicht den gewünschten Erfolg. Erst die Arbeit von *A. Byk*[6]) brachte einen indirekten Beweis, daß zirk. pol. Licht in opt. akt. Verbindungen beide Formen verschieden beeinflußt. Aus *Cottons* Nachweis der verschieden starken Absorption von d- und l- zirk. pol. Lichtstrahlen konnte nicht mit Sicherheit auch auf eine verschieden starke chemische Wirkung geschlossen werden, da zwar jeder chemisch

---

[1]) Ber. d. dtsch. chem. Ges. **36**, 2576.

[2]) Ber. d. dtsch. chem. Ges. **37**, 349.

[3]) Inaug.-Diss. Heidelberg 1896.

[4]) Lagerung der Atome im Raume.

[5]) Annal. de Chim. et Phys. **8**, 347. 1896.

[6]) Zeitschr. f. physikal. Chem. **49** 641.

wirkame Strahl absorbiert werden muß, jedoch nicht jeder absorbierte Strahl chemisch wirksam ist. *Byk* führte nun auf Grund des Satzes von der Übereinstimung der Maxima der optischen Absorption und der photochemischen Empfindlichkeit und der Tatsache der Zersetzung von weinsaurem Kupferoxydalkali, den indirekten Beweis der verschiedenen Beeinflussung der Komponenten eines Racemkörpers im d- und l- zirk. pol. Lichte. Die Zersetzungsprodukte waren jedoch inaktiv.

Es scheint also, daß bisher weder die analytische noch die synthetische Methode bei ihren Versuchen durch Anwendung magnetischer oder optischer Einflüsse asymmetrische Synthese zu erzwingen, Erfolge zu erzielen vermochte. Es ist nun von Interesse, daß asymmetrische Synthesen in Gegenwart opt. akt. Substanzen durchgeführt werden konnten, die vielleicht die Bildung einer Komponente katalytisch beeinflußten. Diese Synthesen bilden auch Stützen für *Erlenmeyer*s Theorie der asymmetrischen Induktion[1]), da der Zusatzkörper an der Reaktion beteiligt war oder, wie mehrfach nachgewiesen wurde, wenigstens intermediär in diese eingriff (*Markwald* und *Mc Kenzie*[2]), *Bredig* und *Fiske*[3]), *Rosenthaler*[4])). Lösungen opt. akt. Körper besitzen nun die Eigenschaft das Licht zirkular zu polarisieren (dies ist ja das Charakteristische der optischen Aktivität), so daß wieder ein d- oder l-Strahl bei der Reaktion zugegen ist. Der opt. akt. Körper wäre also hier Erzeuger des zirk. pol. Lichtes. Die Bedeutung des zirk. pol. Lichtes für die Entstehung asymmetrischer Verbindungen ist jedenfalls schon von verschiedenen Forschern in Betracht gezogen worden und *Abderhaldens* „Lehrbuch der physiologischen Chemie“ berichtet hierüber folgendes[5]):

„Es ist auch die Ansicht ausgesprochen worden, daß die optisch asymmetrische Synthese dadurch bewirkt werde, daß infolge unregelmäßiger Reflexion des linear polarisierten Anteils des Himmelslichtes an der Wasserfläche des Meeres zirk. pol. Licht entstehen soll. Die Drehung der Polarisationsebene des Lichtes durch den Erdmagnetismus bewirkt, daß hierbei weder an einem Punkte, noch auf der ganzen Erdoberfläche gleiche Mengen beider Lichtsorten entstehen.“ „Würde nun die eine Art des zirk. pol. Lichtes überwiegen, dann könnte man sich vorstellen, daß die Synthese einer bestimmten opt. akt. Form begünstigt wird. Diese Hypothese würde das primäre Auftreten opt. akt. Formen ohne bereits bestehende opt. asym. Verbindungen erklären. Sie ist jedoch zur Zeit experimentell noch zu wenig gestützt.“

Ich habe mich nun bemüht, eine asymmetrische Synthese durch Anwendung zirk. pol. Lichtes zu verwirklichen. Dieses ist mir nicht gelungen. Trotz des negativen Befundes seien aber meine Versuche hier mitgeteilt, da ihnen vielleicht doch theoretische Bedeutung zukommt.

Zur Erzeugung des zirk. pol. Lichtes diente das Verfahren, das zuerst von *Mascart* benutzt wurde. Ein linear polarisierter Lichtstrahl wurde durch ein sog. $^1/_4\,\lambda$-Glimmerplättchen, dessen optische Achse mit der Schwingungsebene des Lichtstrahles einen Winkel von $^1/_4\,\pi$ oder eines

[1]) *Erlenmeyer* nimmt bekanntlich eine der magnetischen Kraft analoge in der opt. akt. Substanz an, die die entgegengesetzte Komponente eines Racemkörpers anzieht, die gleichnamige abstößt. Es wäre also bei einer Reaktion neben der chem. Affinität, noch die asymmetrische Wahlverwandtschaft entscheidend.

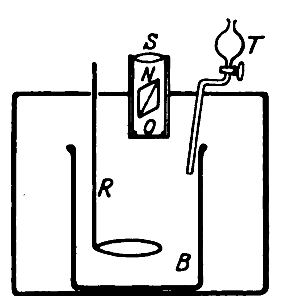
[2]) Ber. d. dtsch. chem. Ges. **32**, 2130; **34**, 469.

[3]) Diese Zeitschr. **46**, 7.

[4]) Diese Zeitschr. **14**, 238.

[5]) l. c. 3. Aufl., S. 91.

ungeraden Vielfachen davon einschloß, fallen gelassen. Der austretende Lichtstrahl war dann zirk. polarisiert, und zwar entgegengesetzt für $^1/_4\,\pi$, $^5/_4\,\pi$ usw. einerseits und $^3/_4\,\pi$, $^7/_4\,\pi$ usw. anderseits. Die untenstehende Figur zeigt einen Schnitt des von mir verwendeten Apparates. *S* ist eine Sammellinse zur Konzentration des Lichtes, *N* ein *Nicol*sches Prisma, *O* ein $^1/_4\,\lambda$-Glimmerplättchen. *B* ist ein Becherglas, in dem sich das zu bestrahlende Reaktionsgemisch bzw. am Beginne der Reaktion, eine Komponente befand, während die andere aus *T* zutropfen gelassen wurde. *R* ist ein Rührer, der zur zeitweisen Homogenisierung des Gemisches diente, da sich sonst Schichtenbildung zeigte. Das Licht wurde von einer Metallfadenlampe von 250 Kerzen und in 2 Versuchen von einer Quecksilberbogenlampe geliefert. Es wurde unter einem Winkel von 90° in die Flüssigkeit einfallen gelassen. Auf die Verwendung einfarbigen Lichtes wurde verzichtet, da vorerst festgestellt werden sollte, ob im weißen Lichte, das ja ein Gemisch der einfarbigen Lichtarten ist, die gewünschte Reaktion eintrat. Da die elektrische Glühlampe kein ultraviolettes Licht aussendet, wurden noch 2 Versuche in solchem durchgeführt. Die Bestrahlung erfolgte durch 4 Stunden. Durch $3^1/_2$ Stunden wurde zutropfen gelassen, in der letzten halben Stunde nachbestrahlt. Die Homogenisierung des Gemisches erfolgte nach je 30 Minuten durch 3maliges Auf- und Abbewegen des Rührers.



Als Reaktion diente die Darstellung der Bisulfitverbindung des Acetaldehyds, die ein asym. C-Atom enthält, jedoch wenig beständig ist. Daher wurde sie vor der polarimetrischen Untersuchung in Milchsäure verwandelt. Diese Reaktion hat den Vorteil, daß sie bei gewöhnlicher Temperatur abläuft, ziemliche Ausbeuten liefert, und daß die Milchsäure ein genügendes spezifisches Drehungsvermögen besitzt. Die Synthese wurde derart durchgeführt, daß entweder Natriumbisulfit zu dem Aldehyd getropft wurde oder umgekehrt Aldehyd zu Bisulfit hinzugefügt wurde. Die Bisulfitverbindung wurde dann mit Cyankali umgesetzt, wodurch das Cyanhydrin der Milchsäure entstand. Obwohl die Bisulfitverbindung, wie bereits oben bemerkt wurde, ein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthält, also evtl. bereits opt. akt. sein müßte, wurde in einer Reihe von Versuchen die Umsetzung mit KCN ebenfalls im zirk. pol. Lichte durchgeführt. Das Cyanhydrin wurde dann mit Äther aus der wässerigen Lösung ausgeschüttelt, die ätherische Lösung mit entwässertem Glaubersalz getrocknet, der Äther abdestilliert und das Cyanhydrin durch Kochen mit HCl am Rückflußkühler verseift. Die entstandene Milchsäure wurde dann polarimetrisch untersucht

und eine quantitative Bestimmung durchgeführt. Polarisiert wurde sowohl die Milchsäurelösung als auch die Lösung ihres Molybdänsäurekomplexsalzes, das ein 20faches sp. Drehungsvermögen besitzt. Dieses wurde durch Zusatz von MoO_3 zu der sauren Lösung und nachfolgende Neutralisation mit Na_2CO_3 dargestellt. In keinem Falle konnte eine Drehung der Polarisationsebene nachgewiesen werden; auch die aufgesammelten Produkte von 5 Versuchen, die zusammen untersucht wurden, um etwa vorhandene sehr geringe Aktivität durch größere Mengen Milchsäure sichtbar zu machen, waren racemisch. Zur quantitativen Bestimmung der Milchsäure wurde das bei der Verseifung gebildete NH_3 in üblicher Weise mit NaOH ausgetrieben, in vorgelegter $^n/_{10}$-HCl aufgefangen und der Überschuß derselben zurücktitriert. Ein NH_3 entsprach einem Molekül Milchsäure. Die Ausbeuten von 10 Versuchen bei Bestrahlung mit der Glühlampe ohne Verwendung des Rührers betrugen im Durchschnitt 10% des verwendeten Aldehydes (es wurden je 10 g desselben verwendet). 10 analoge Versuche, bei denen das Rührwerk betätigt wurde, ergaben durchschnittlich 15%. Die beiden Versuche mit U-Licht, mit Verwendung des Rührwerks, lieferten 17%.

Bei der Untersuchung der aufgesammelten Produkte von 5 Versuchen waren 7 g Milchsäure vorhanden. Da eine 10,5 proz. Lösung eine Drehung von $[\alpha]_D^{15} = +3{,}82$ besitzt, wären noch 0,284% aktiver Milchsäure nachweisbar gewesen. Da dies nicht der Fall war, war tatsächlich keine aktive Milchsäure vorhanden.

Diese Versuche haben also nicht zu dem erstrebten Ziele geführt. Ich gedenke sie unter veränderten Bedingungen fortzusetzen.

Serologische Versuche mit Antigenen und Antikörpern an der überlebenden künstlich durchströmten Leber.

III. Mitteilung.

Versuche mit Agglutininen.

Von

Martin Hahn und **Emil v. Skramlik.**

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 2. März 1922.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Während man über den Vorgang der Agglutination im Reagensglase und teilweise auch im Tierkörper sehr wohl Aufschluß zu geben vermag, ist man ganz im unklaren über das Verhalten der Agglutinine zu den Körperzellen. Bekanntlich sucht sich bis zu einem gewissen Grade der Organismus der Agglutinine zu entledigen. Einen Beweis dafür bildet unter anderem das Auftreten von Agglutininen im Harn. Indessen liegen die Verhältnisse keineswegs so einfach, wie es hiernach scheinen könnte, denn wir wissen weiter, daß die Agglutinine sehr lange im Kreislauf bleiben, auch wenn die für ihr Auftreten verantwortlichen Mikroorganismen schon längst nicht mehr nachweisbar sind. Man könnte also annehmen, daß trotzdem noch dauernd Agglutinine gebildet werden oder aber daß sich während des Infektionsprozesses Reservoire von Agglutininen im Körper bilden, aus denen diese dauernd an die Blutbahn abgegeben werden.

Zur Klärung dieser Fragen ist es zunächst notwendig zu wissen, wie sich die fertigen Agglutinine den Organzellen gegenüber verhalten. Als eine geeignete Methode zum Studium dieser Vorgänge hat sich die künstliche Durchströmung der Leber erwiesen und wir konnten schon in unserer ersten Mitteilung[1]) einige Befunde auf diesem Gebiete mitteilen.

Untersucht wurde im künstlichen Kreislauf durch die Meerschweinchenleber[2]) das Typhus- und Coliagglutinin und zwar beide in einer

---

[1]) *M. Hahn* und *Emil v. Skramlik*, diese Zeitschr. **98**, 120. 1919.

[2]) *E. v. Skramlik*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **180**, 1. 1920.

Verdünnung von 1 : 1000. Während wir bei den übrigen Versuchsreihen Ringerlösung in der Modifikation von *Locke* gewählt hatten, konnten bei diesen Versuchen nur 0,85% NaCl-Lösung verwendet werden. Dies hatte seinen Grund in einer merkwürdigen Hemmungswirkung der Agglutination, die wohl mit dem Ca-Gehalt der *Ringer*schen Flüssigkeit in Zusammenhang steht und sich daran äußerte, daß die Bakterienagglutination bei Verwendung der üblichen Sera bloß bis zu einer Verdünnung von 1 : 1000 auftrat, während sie in Kochsalzlösung noch bis 1 : 32 000 ging. Die Experimentaltechnik war die gleiche wie bei unseren früheren Versuchen; die verwendeten Meerschweinchen hatten ein Durchschnittsgewicht von 600 g. Vor Beginn eines jeden Versuches wurde die Leber mit Hilfe von durchgeleiteter Ringerlösung sorgfältig von allen Blutresten befreit.

Leitet man längere Zeit durch eine Leber typhus- oder coliagglutinierendes Serum in 0,85proz. NaCl-Lösung verdünnt im Verhältnis 1 : 1000, dann ergibt die fortlaufende Prüfung des Agglutiningehaltes der Durchströmungsflüssigkeit eine Verminderung, die um so größer ist, je länger der Versuch im Gang bleibt. Eine Ausdehnung der Experimente über 3 Stunden war nur schwer möglich. Wie aus den Mitteilungen von *Skramlik* und *Hünermann*[1]) hervorgeht, wirkt die NaCl-Lösung auf die Leberzellen schwer schädigend ein, was sich auch schon makroskopisch in einer zunehmenden Undichtigkeit des Präparates bemerkbar macht. Es entwickeln sich starke Ödeme, die zum Einreißen der Leberkapsel führen. Aus der nachfolgenden Tabelle geht hervor, daß im Verlaufe von 2 Stunden eine deutliche Verminderung des Agglutiningehaltes in der kreisenden Flüssigkeit nachweisbar sein kann, die aber auch schon nach 1stündigem Gang des Versuches bemerkbar ist.

Tabelle I.

Verminderung des Agglutiningehaltes.

Versuch	Art der Agglutinine	Titer einer Probe entnommen nach 5′	60′	120′ Kreislauf
Nr. 17. 15. V. 19.	Typhus	1 : 32000 +	1 : 16000 +	1 : 8000 +
„ 1. 6. XI. 19.	Typhus	1 : 20000 +	1 : 16000 Spur	—
„ 3. 20. XI. 19.	Typhus	1 : 32000 Spur	1 : 8000 +	—
„ 5. 4. XII. 19.	Coli	1 : 1600 +	1 : 1000 +	—
„ 6. 10. XII. 19.	Coli	1 : 1600 +	1 : 1200 +	—

Zwischen Typhus- und Coliagglutininen macht sich ein Unterschied in den festgehaltenen Mengen geltend; die letzteren wurden in unseren Versuchen viel weniger von den Zellen gebunden. Der Befund lehrt aber jedenfalls, daß die Körperzellen sich den Agglutininen gegenüber

[1]) *Emil v. Skramlik* und *Theodor Hünermann*, Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **11, 319. 1920.**

durchaus nicht indifferent verhalten. Eine weitere Stütze erfährt diese Ansicht durch die Feststellung, daß der Eiweißgehalt der durchgeleiteten Flüssigkeit fortdauernd steigt, nach 1stündigem Gang des Versuches bis auf über 0,2% gegenüber dem normalen Befund von 0,01% selbst nach vielstündiger Durchleitung von reiner NaCl- oder Ringerlösung. Die Agglutinine erweisen sich also weiter als Substanzen, die die Leberzellen zu schädigen vermögen und unter diesem Gesichtspunkt verdienen sie die Bezeichnung *als Zellgifte*, womit aber über die Konzentration, in welcher sie im lebenden Organismus giftig wirken, zunächst noch nichts gesagt werden kann.

Um über den Verbleib der Agglutinine ins Klare zu kommen, haben wir verschiedene Versuche angestellt.

1. Ersetzt man die durchgeleitete agglutininhaltige Flüssigkeit durch reine 0,85 proz. Kochsalzlösung und durchströmt das Organ längere Zeit, so enthalten Proben der Spülflüssigkeit nicht einmal Spuren von Agglutinin. Man ist nicht imstande, das in der Leber verbliebene Agglutinin *auszuwaschen*. Die Verankerung an die Leberzellen ist also doch eine feste. Dies gilt sowohl für das Typhus- wie für das Coliagglutinin, wenn auch die Verminderung bei Coli sehr viel geringgradiger war und ein Nachweis in den Spülflüssigkeiten damit schwerer fällt.

2. Dieses Resultat legte die Frage nahe, ob das von den Zellen festgehaltene Agglutinin noch eine Wirkung auf Bakterien auszuüben vermag. Zu diesem Zweck wurden nach weiterer gründlicher Ausspülung der mit Agglutininen vorbehandelten Leber filtrierte Bakterienaufschwemmungen von Typhus- und Colistämmen (in der Regel 3 Agarröhrchen auf 100 ccm NaCl-Lösung) durchgeleitet. Dabei stellte sich heraus, daß die trüben Suspensionen schon nach kurzem Durchgang durch das Organ heller werden und zwar in steigendem Grade, je länger der Versuch im Gang bleibt. Um mit Sicherheit festzustellen, daß die Aufhellung der Suspension auf einer Abnahme der Bakterienzahl beruht, wurden Auszählungen der Keime vorgenommen und zwar nur bei den Colibakterien, die lebend eingeführt wurden, während die Typhusbakterien durch halbstündiges Erwärmen auf 60° abgetötet worden waren. Über die gefundenen Zahlen gibt die nachfolgende Tabelle II Aufschluß.

Tabelle II.

Verminderung der Bakterienzahl beim Durchgang durch eine Leber, die mit Agglutinin vorbehandelt wurde.

Versuch		Zahl der Bakterien im ccm nach 5′	20′ Durchgang
Nr. 5. 4. XII. 19.	Coli	$8{,}7 \cdot 10^8$	$0{,}86 \cdot 10^8$
„ 6. 10. XII. 19.	Coli	$21{,}0 \cdot 10^9$	$1{,}4 \cdot 10^9$

Sie lehrt, daß in einem Zeitraum von 15 Minuten die Zahl der Bakterien auf $^1/_{10}$—$^1/_{20}$ abnimmt. Der Grund für diese Abnahme ist in einer Agglutination der Bakterien zu suchen, die im Inneren des vorbehandelten Organes vor sich geht (siehe Abbildung 1). Tritt sie in größerem Umfange auf, was besonders dann der Fall sein wird, wenn viel Agglutinin verankert wurde und eine dichte Bakterienaufschwemmung verwendet wird, so muß es zu einer teilweisen Verlagerung von Capillargebieten kommen. Tatsächlich konnte eine solche auch daran erkannt werden, daß der zur Durchleitung der Flüssigkeit erforderliche Druck allmählich auf das 1,5—2fache seines ursprünglichen Wertes stieg. Betrug er also zu Beginn der Durchströmung des Organs mit der bakterienhaltigen Flüssigkeit im Durchschnitt 20 mm Hg, so stieg er im Verlauf von 20 Minuten je nach der Dichtigkeit der Suspension auf 30, ja sogar 40 mm Hg.

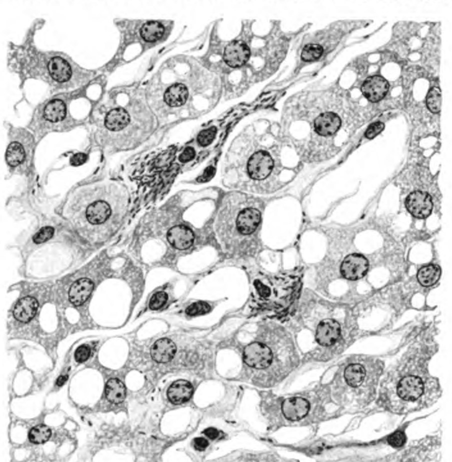


Abb. 1. Schnitt durch eine Leber, die zuerst eine Stunde lang mit coliagglutinierendem Serum in Ringerlösung (Verdünnung 1 : 1000), nach dessen gründlicher Ausspülung eine weitere Stunde mit einer Aufschwemmung von Colibakterien durchspült wurde. Versuch 13 vom 18. XII. 1919. Durchströmungsdruck 16 mm Hg. Die Leberzellen sind hochgradig geschädigt, eine Wirkung, die wahrscheinlich auch auf das Agglutinin zurückzuführen ist. In den Kupfferschen Sternzellen erkennt man ganze Haufen von Bakterien, auch in den Gefäßen sind ganze Züge, die zu Vertopfungen Anlaß geben. (Homog. Immersion 1/12. Ok. 3.)

Ein weiteres Verfahren, sich von dem Zustand der Bakterien in einer mit Agglutinin vorbehandelten Leber zu überzeugen, ist die Anfertigung histologischer Schnitte. Aus diesen geht nun (s. Abb. 1) mit aller Sicherheit hervor, daß die Bakterien sich in reicher Menge agglutiniert in den Capillaren, vor allem aber in den *Kupffer*schen Sternzellen finden.

Man hätte nun daran denken können, daß die Bakterien bei der Durchleitung durch das Organ in größeren Mengen *abfiltriert* werden. Bestimmt man fortlaufend den Gehalt an Bakterien bei längerem Durchströmen der Flüssigkeit durch ein frisches, *unbehandeltes* Organ, so zeigt sich aber nicht etwa eine *Abnahme*, sondern meist sogar eine *Vermehrung* der Keimzahl. Das zeigt die folgende Tabelle III.

Tabelle III.

Versuch	Zahl der Bakterien in 1 ccm nach 5′	30′	60′	90′	120′
	Organ-Durchströmung				
Nr. 7. 17. XII. 19.	$1,1 \cdot 10^9$	$0,9 \cdot 10^9$	$0,9 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^9$	$0,6 \cdot 10^9$
„ 14. 6. V. 19.	$0,1 \cdot 10^9$	$0,1 \cdot 10^9$	$0,9 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^9$

Auffallenderweise war aber auch in solchen Fällen, wo die Bakterienzahl keine Verminderung erfuhr, nach dem Durchleiten durch die Leber eine Aufhellung der Suspension zu beobachten, eine Erscheinung, der noch weiter nachgegangen werden soll.

Zu gleichem Ergebnis wie die Keimzählung führte auch die histologische Untersuchung. In einer Leber, die 2 Stunden lang mit einer Bakteriensuspension durchströmt wurde, sind (siehe Abb. 2) zwischen den Zellen nur ganz vereinzelt Bakterien. Zu bemerken ist, daß Colibakterien eine gewisse Zeit nach Beginn der Durchströmung in der Gallenblase nachweisbar waren. Ob sie dorthin auf Grund ihrer allerdings nur sehr geringen Eigenbewegung gelangten oder mit Hilfe der Saftströmung, war durch unsere Versuche nicht zu entscheiden.

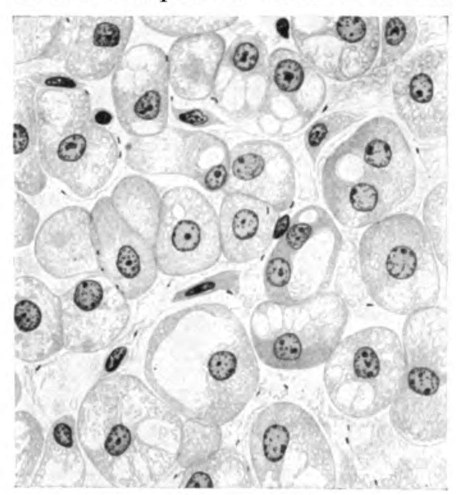


Abb. 2. Schnitt durch eine unbehandelte Leber, die 2 Stunden lang von einer dichten Colibakteriensuspension in Ringerlösung durchströmt und mit ihrem letzten Flüssigkeitsgehalte fixiert wurde. Man sieht in den Gefäßen und zwischen den Zellen nur ganz vereinzelte Bakterien. (Homog. Immersion 1/12. Ok. 3.)

Wie im Reagensglase, so war auch im Organ nach Vorbehandlung mit einem agglutinierenden Serum eine Mitagglutination von fremden Bakterienarten festzustellen. So wurden, allerdings in beschränktem Umfang, Colibakterien agglutiniert in einer Leber, die von Typhusagglutinierendem Serum durchströmt worden war. Und das gleiche war der Fall bei Typhusbakterien nach Vorbehandlung eines Organs mit coliagglutinierendem Serum. Die Zahl der Bakterien nimmt also bei Durchleitung durch ein vorbehandeltes Organ stets ab, aber doch am meisten, wenn Serum und Bakterien homolog sind. Freilich bleiben auch im letzteren Falle in der kreisenden Flüssigkeit Bakterien in großer Zahl, was seinen Grund in der Erschöpfung des Agglutinins haben dürfte.

Zusammenfassung.

Die Versuche lehren: 1. Kreisende Agglutinine werden bei längerer Versuchsdauer in geringer Menge ins Lebergewebe aufgenommen und lassen sich mechanisch daraus nicht mehr entfernen. Zwischen Typhus- und Coliagglutinin macht sich ein quantitativer Unterschied in der festgehaltenen Menge bemerkbar. Typhusagglutinin wird in weitaus größeren Mengen festgehalten.

2. Die Agglutinine wirkten bei der vorliegenden Versuchsanordnung auf die Organzellen als Gift. In der kreisenden Flüssigkeit treten fortlaufend größere Mengen von Eiweiß auf.

3. Leitet man durch ein Organ, das eine Stunde lang mit Agglutinin durchströmt und danach mit Ringerlösung vollständig ausgespült wurde, eine Aufschwemmung der passenden Bakterien, so tritt in den Capillaren eine Agglutination ein. Die Bakterienzahl erfährt im Verlauf von wenigen Minuten eine Verminderung auf $^1/_{10}$—$^1/_{20}$. Der Beweis für die eingetretene Agglutination wurde durch die histologische Untersuchung der Organe geliefert.

Über den mikrochemischen Nachweis von Tryptophan in der Pflanze.

Von

Fritz Kretz.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institute der Universität in Wien, Nr. 179 der zweiten Folge.)

(Eingegangen am 4. März 1922.)

I. Einleitung.

Die Ergebnisse der Eiweißforschung der letzten Jahre weisen übereinstimmend auf die besondere Bedeutung der cyclischen Eiweißkomponenten für die Erhaltung des Stickstoffgleichgewichtes im tierischen Organismus hin. Die anfängliche Anschauung von der Unersetzlichkeit sämtlicher im aufzubauenden Eiweiß vorhandenen Aminosäuren, mit Ausnahme des Glykokolls, das ja in allen anderen α-Aminosäuren gewissermaßen als Baustein vorhanden ist, hat insofern eine Einschränkung erfahren, als die Synthese einzelner aliphatischer Aminosäuren aus Fettsäuren und Ammoniak im tierischen Organismus nachgewiesen[1]) und auch die Bildung einer aromatischen Eiweißkomponente, des Prolins, aus einer aliphatischen Aminosäure, der Glutaminsäure, wahrscheinlich gemacht wurde[2]). Für die Unfähigkeit, andere cyclische Komponenten, wie Tryptophan, aufzubauen, wurde diese Anschauung durch eine große Anzahl von Versuchen bewiesen. Während vollständig abgebautes Casein, also ein Gemisch aus allen natürlich vorkommenden Aminosäuren, den tierischen Organismus befähigt, seinen Stickstoffhaushalt im Gleichgewicht zu halten, gewährleistet sonst vollkommen gleiches Casein, aus dem eine einzige Komponente, das Tryptophan, entfernt wurde, eine ausreichende Ernährung nicht mehr[3]). Diese Tatsache läßt sich im allgemeinen durch die von *Osborne* vertretene Annahme erklären, daß dem tierischen Organismus die von ihm als „Cyclopoiese" bezeichnete Fähigkeit der Pflanze abgeht, cyclische Verbindungen aufzubauen[4]).

---

[1]) *F. Knoop*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **67**, 489. 1910; *G. Embden*, diese Zeitschr. **29**, 423. 1910.

[2]) *E. Abderhalden*, Synthese der Zellbausteine. Berlin 1912, S. 87.

[3]) *E. Abderhalden*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **61**, 194. 1910.

[4]) *Th. Osborne*, Ergebnisse der Physiol. **10**, 47. 1910.

Die Kenntnis des Vorkommens von Tryptophan in pflanzlichen Eiweißkörpern erscheint somit von Bedeutung für ihre Bewertung als Nahrungsmittel des Menschen, während es für Studien über Ort und Art der Assimilation der Eiweißbausteine in der Pflanze von Interesse ist, das Schicksal einer Aminosäure im Verlaufe des Stoffwechsels verfolgen zu können[1]).

Für Untersuchungen über Tryptophan von phytochemischer Seite hat sich in erster Linie als notwendig erwiesen, es mikrochemisch im Gewebe nachweisen zu können; es war dies durch den Umstand ermöglicht, daß Tryptophan sich vor allen anderen Aminosäuren durch eine Reihe von schönen Farbenreaktionen auszeichnet (Reaktion nach *Voisenet*, ***Hopkins***, ***Ehrlich***, die Bromwasserreaktion u. a.). Die Fähigkeit des Tryptophans (Indolaminopropionsäure), leicht Farbstoffe zu bilden, erklärt sich aus seiner Ableitung vom Indol, das in naher Beziehung zur großen Farbstoffgruppe des Indigo steht. Seine Konstitutionsformel ist:

```
        CH
      ╱    ╲
   HC        C       C · CH₂ · CH · COOH .
   |                                |
   HC        C       CH            NH₂
      ╲    ╱   ╲    ╱
        CH       NH
```

Zu einem mikrochemischen Nachweis ließ sich die von ***Fürth*** methodisch erforschte Reaktion von *Voisenet* in geeigneter Weise verwenden[2]).

II. Methodik des Tryptophannachweises.

Die *Voisenet*sche Reaktion, die von ***Fürth*** auch für quantitative Tryptophanbestimmungen ausgearbeitet wurde, besteht in einer violetten Färbung tryptophanhaltiger Lösungen auf Zusatz von konzentrierter Salzsäure im Überschuß und Spuren von Formaldehyd und Natrium- oder Kaliumnitrit. Ihre Empfindlichkeitsgrenze liegt makrochemisch angewendet bei einer Konzentration von 1 : 50 000[3]).

Die von *Voisenet* ursprünglich als Formaldehydnachweis angegebene Reaktion ist nach ***Fürth*** für das Tryptophan, d. h. die Indolgruppe im Eiweiß, streng spezifisch und tritt auf, gleichgültig ob das Tryptophan noch im intakten Protein oder einem intermediären Abbauprodukt gebunden ist oder durch weitgehenden Abbau schon als Aminosäure in Freiheit gesetzt wurde. Es gibt in jeder Form, in Lösung wie im Niederschlag, gebunden oder frei, eine bei größerer Konzentration tiefviolette Farbe, während seine weiteren Abbaustufen Skatol und Indol eine

---

[1]) Für die Anregung zu diesem Thema bin ich Herrn Dr. *Gustav Klein* zu Dank verpflichtet.

[2]) ***O. Fürth*** und ***E. Nobel***, diese Zeitschr. **109**, 103. 1920. 1. Mitteilung. ***O. Fürth*** und ***F. Lieben***, diese Zeitschr. 1920—1921. 2.—6. Mitteilung.

[3]) ***Fürth***, l. c. 2. Mitteilung.

blassere, mehr rötliche Reaktion geben. Für die dazwischenliegenden Abbaustufen des Tryptophans, Indolpropionsäure und Indolessigsäure, die mir in chemisch reiner Form nicht zur Verfügung standen, wurde die Reaktion nicht erprobt, doch ist anzunehmen, daß sie ein in der Mitte zwischen dem des Tryptophans und Indols liegendes Verhalten zeigen.

Ein Nachteil der Reaktion ist ihre große Empfindlichkeit gegen störende Einflüsse; so genügt schon ein geringes Abweichen von den als optimal erkannten Konzentrationen der Bestandteile des Reagens, um die Reaktion schwächer erscheinen zu lassen oder ganz zu verhindern. Auch die Anwesenheit mancher Schwermetallionen, wie Eisen oder Kupfer, kann störend einwirken, während Quecksilber keinen Einfluß hat, was schon aus der Anwendung seines Chlorides als Fixierungsmittel hervorgeht. Von großer Bedeutung ist auch eine möglichst hohe Konzentration der verwendeten Salzsäure. Am besten hat sich eine von der Dichte 1,19 bewährt; während eine von der Dichte 1,17 die Reaktion bedeutend schwächer erfolgen läßt, ist eine von noch geringerer Dichte überhaupt unbrauchbar. Die Unerläßlichkeit der Anwendung chemisch reiner Reagenzien geht aus all dem zur Genüge hervor. Ebenso ist es unbedingt erforderlich, das Reagens erst unmittelbar vor dem Gebrauche anzusetzen, da es nur kurze Zeit haltbar ist; in einzelnen Fällen, wo bei geringem Tryptophangehalt des Untersuchungsobjektes ein kleiner Fehler in der Beschaffenheit des Reagens ein Ausbleiben der Reaktion und somit ein falsches Resultat zur Folge haben kann, ist es ratsam, das Reagens nach längstens 2stündigem Gebrauche zu erneuern.

Der mikrochemischen Anwendung dieser schon makrochemisch leicht versagenden Reaktion stellten sich anfangs große Schwierigkeiten entgegen, bedingt durch die Anwendung von konzentrierter Salzsäure, die einerseits in einem raschen Diffundieren des gebildeten Farbstoffes durch Abbau des reagierenden Eiweißkörpers zum Ausdruck kommen, andererseits in der raschen Auflösung der Gewebe, die schon beim Auflegen eines Deckglases in einen strukturlosen Brei zerfließen. Für den Nachweis von Tryptophan in größeren Gewebestücken, ohne Rücksicht auf seine Lokalisation in einzelnen Zellen oder Zellinhaltskörpern, ist die Reaktion direkt in der makrochemisch angewandten Weise verwendbar.

Eine Methode, dem Zerfließen der Gewebe zu begegnen, verdanke ich einem freundlichen Rate von Professor *Fritz Emich* in Graz, die zu untersuchenden Präparate durch ein Kieselsäureskelett widerstandsfähig zu machen. Dies ließ sich leicht mit Durchtränken der Schnitte mit einer wässerigen Lösung von Natriumsilicat und darauffolgendes Übertragen in die konzentrierte Salzsäure des Reagens erreichen.

Durch Einwirkung stärkerer Säuren wird die Kieselsäure des Natriumsilicates in Freiheit gesetzt und fällt als chemisch nur äußerst schwer angreifbares Gel aus, welches, das Präparat in allen Einzelheiten seiner Struktur einhüllend, die Auflösung der Gewebe hintanhält. Ein weiterer Vorteil dieser Kieselsäuremembran, die in so dünner Schicht das mikroskopische Bild in keiner Weise beeinträchtigt, besteht in ihrer Semipermeabilität; sie gestattet sehr gut ein Hineindiffundieren des Reagens, läßt aber die, durch Einwirkung der Salzsäure in Lösung gehenden, vorläufig noch großmolekularen Zellinhaltsbestandteile erst nach Verlauf einiger Stunden heraustreten, bis eben ihr Abbau weit genug erfolgt ist.

Um zu prüfen, ob die Kieselgelmethode auch bei Verwendung anderer Säuren, wie Salzsäure, ebenso anwendbar ist, habe ich mit Natriumsilicat behandelte Präparate zur Anstellung anderer Reaktionen benützt, wie der Xanthoproteinreaktion mit rauchender Salpetersäure und Ammoniak, und der Reaktion nach *Molisch* mit α-Naphthol und konzentrierter Schwefelsäure. In beiden Fällen trat die Reaktion, wenn auch etwas verzögert, deutlich ein. Auch zur Resistenzerhöhung der Gewebe bei Anwendung starker Laugen ist das Verfahren geeignet, wenn man die Schnitte nach der Behandlung mit Natriumsilicat zur Ausfällung des Kieselgels auf einige Sekunden in eine konzentrierte Salzsäure überträgt und dann erst die Reaktion, zum Beispiel die Biuretreaktion mit Kupfersulfat und konzentrierter Kali- oder Natronlauge, anstellt.

Um die, durch den raschen Abbau der reagierenden Eiweißkörper verursachte, Diffusion des Reaktionsfarbstoffes auch innerhalb der Zelle zu verzögern sowie die sonst oft weitgehende Deformation der Zellinhaltskörper durch Quellung möglichst hintanzuhalten, ist es vorteilhaft, die zu untersuchenden Präparate einer vorherigen Fixierung zu unterwerfen, d. h. das Eiweiß, ohne seine morphologischen Eigenschaften im wesentlichen zu ändern, in eine schwerer lösliche Form zu bringen. Da ja die in der Cytologie angewandten Fixierungsmethoden auf Eiweißfällung beruhen, so dürften auch alle, die nicht gerade den Ablauf der Reaktion stören, brauchbar sein. Von den untersuchten Fällungsmitteln hat sich Formalin zur Darstellung cytologischer Details am besten bewährt, während Härtung mit Sublimat ein weit rascheres Arbeiten ermöglicht. Es empfiehlt sich also, das Untersuchungsobjekt vorerst in Sublimat gehärtet zu untersuchen und erst dann, wenn eine Untersuchung feinerer Details sich als notwendig herausstellt, die zeitraubendere Formalinhärtung in Anwendung zu bringen, die auch den weiteren Nachteil mit sich bringt, daß sie bei nicht vollständig richtiger Anstellung die Reaktion zu stören imstande ist.

Die Anwendung der Formalinhärtung ist nun folgende: Die zu untersuchenden Schnitte werden auf mindestens eine halbe Stunde in 2- bis höchstens 5 proz. wässerige Formalinlösung eingelegt und dann durch 2 Stunden in fließendem Wasser gründlich gewaschen, um auch in nur geringer Menge vorhandenen freien Formaldehyd zu entfernen.

(Gelangen größere Präparate zur Anwendung, die erst nach der Härtung geschnitten werden, so ist für das Fixieren wie für das Wässern entsprechend mehr Zeit aufzuwenden.) Das Eiweiß wird durch diese Behandlung, ohne seine Struktur zu verändern, gefällt, und es bedarf einer bedeutend längeren Einwirkung der Salzsäure, um den Farbstoff in Lösung zu bringen.

Ein Querschnitt durch die peridermalen Schichten der Kartoffelknolle wurde auf die angegebene Weise in Formalin gehärtet und dann mit dem Voisenetschen Reagens behandelt. In Paraffinöl aufgehoben, zeigte sich nun, daß nach ca. 5 Stunden der Farbstoff aus dem Gewebe herauszudiffundieren begann und den Schnitt wie die umgebende Salzsäure gleichmäßig rotviolett färbte. Nach ungefähr 3 Tagen war der in Lösung gegangene Farbstoff vollständig zerstört. Protoplasma, Kern und Eiweißkrystalle blieben aber in allen Einzelheiten ihrer Struktur wochenlang erhalten. Es scheint, daß die geringe Menge Salzsäure, die im Präparat vorhanden ist, nach einiger Zeit mit gelösten Eiweißabbauprodukten derart übersättigt ist, daß sie den Rest der doch ziemlich reichlich vorhandenen Eiweißkörper nicht zu lösen vermag.

Zur Sublimathärtung verwendet man am besten eine Lösung von etwa 2% und läßt sie durch 10—15 Minuten einwirken. Die Präparate können dann ohne weitere Waschung direkt zur Anstellung der Reaktion benutzt werden. Bei Anwendung geringerer Konzentrationen, 0,1%, bleiben zwar die Einzelheiten der Struktur besser erhalten, wenn auch nicht so wie bei der Formalinhärtung, doch ist dann eine Fixierungsdauer von ca. 24 Stunden nötig, um auch leichtlösliche Eiweißkörper genügend zu härten, was den Vorteil der raschen Arbeitsmöglichkeit nimmt.

Zur Anstellung der Reaktion hat sich folgende Arbeitsweise als geeignet erwiesen: Schnitte, die auf eine der beschriebenen Arten fixiert worden sind, werden auf 3—5 Sekunden in eine wässerige Lösung von Natriumsilicat (Dichte 1,10) gebracht, dann 1—2 Sekunden in destilliertem Wasser abgespült und mit Glasnadeln in das *Voisenet*sche Reagens übertragen, das sich in seiner Zusammensetzung direkt aus den von *Fürth* gemachten Angaben ergibt:

1 Tropfen Formaldehyd 2%,
1 Tropfen 0,5proz. wässerige Lösung von Natriumnitrit[1]),
10—15 ccm Salzsäure (D = 1,19).

In diesem Reagens, am besten in einer Glasdose mit aufgeschliffenem Deckel, um ein Abrauchen der Salzsäure zu verhindern, verbleiben die Schnitte bis zum maximalen Eintritt der Reaktion, meist 10—15 Minuten, unter Umständen aber auch etwas länger bis zu einer halben Stunde. In einigermaßen tryptophanreichen Geweben ist dies schon

[1]) Da Natriumnitrit in verdünnter Lösung sich rasch zersetzt, empfiehlt es sich nach *Fürth* eine 5proz. wässerige Stammlösung zu machen und diese erst vor dem Gebrauche entsprechend zu verdünnen.

makroskopisch an der violetten Tönung des Schnittes zu erkennen. Hierauf werden die Schnitte wieder mit Glasnadeln vorsichtig auf einen Objektträger in einen Tropfen Paraffinöl übertragen und mit einem Deckglas bedeckt. Das Paraffinöl verhindert ein Abrauchen der Salzsäure und erhält so die zum Bestehen der Reaktion nötige Salzsäurekonzentration im Präparat; auch ist so eine Gefährdung der Frontlinse des Mikroskops durch Salzsäuredämpfe so gut wie ausgeschlossen.

Werden die Präparate nach der Behandlung mit Natriumsilicat gar nicht in Wasser abgespült, so bleiben sie infolge allzureichlicher Gelbildung oft an der Glasnadel hängen. Wäscht man sie nur ungenügend aus, so fällt im an sich durchsichtigen Kieselgel eine Unmenge farbloser Krystalle aus, die oft so massenhaft auftreten können, daß sie die mikroskopische Untersuchung beeinträchtigen. Das allzureichliche Auftreten der Kristalle besagt, daß nach dem Natriumsilicat etwas länger gewaschen werden muß, doch darf man das Waschen wieder nicht allzulange ausdehnen, da sonst die Kieselmembran nicht zur Bildung gelangen kann. Versuche mit reiner Substanz haben ergeben, daß die Krystalle Natriumchlorid sind, das ja in konzentrierter Salzsäure unlöslich, beim Verdünnen oder bloßem Abrauchen derselben in Lösung geht. Die Krystalle fallen in 3 verschiedenen Formen aus, je nachdem in welcher Umgebung sie zur Bildung gelangen. An Stellen mit wenig Gel und einem Überschuß von Salzsäure sind sie reine Würfel, mehr gegen Stellen reichlicher Gelbildung zu zeigen die Würfel eine eigentümliche Einkerbung der Kanten, und endlich an Stellen reichlichster Gelbildung sind kleinste würfelartige Krystalle zu eigentümlichen kreuzähnlichen Gebilden angeordnet.

Zur mikroskopischen Untersuchung ist eine gleichmäßige Lichtquelle angezeigt, am besten elektrisches Licht. Durch Weglassen des normal gebrauchten Blauglases kann in manchen Fällen der Kontrast der Reaktionsfarbe gegen die Umgebung verstärkt werden. Auf diese Weise war die Farbe der Reaktion sogar bei 1500facher Vergrößerung (Zeiss, hom. Imm. 2 mm n. A. 1,3) noch an den kleinsten Zellinhaltskörpern eindeutig erkennbar.

III. Vorkommen von Tryptophan.

A. Allgemeines.

Daß Tryptophan als Komponente pflanzlicher Eiweißkörper eine ziemlich allgemeine Verbreitung besitzt, geht schon aus einer Zahl von Literaturangaben hervor.

Bei der Hydrolyse von Bakterieneiweiß, in erster Linie von pathogenen Arten, wie Tuberkulose- und Diphtheriebakterien, wurde neben den meisten anderen Eiweißspaltprodukten auch Tryptophan gefunden[1]). Durch besonderen Reichtum an Tryptophan zeichnen sich nach *Thomas* die Eiweißkörper der Hefe aus[2]).

---

[1]) *S. Tamura*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**, 85. 1913; **89**, 243. 1913; **90**. 286. 1914.

[2]) *P. Thomas* und *S. Koloziejska*, Cpt. rend. **156**, 2024; **157**, 243. 1913, **158**, 1597. 1914; *P. Thomas*, Bull. soc. chim. biol. **1**, 67. 1914. *C. Neuberg*, Wochenchr. f. Brauerei **38**, 1915.

Ebenso wurde es bei Untersuchungen an höheren Pilzen gefunden Aspergillus niger von *Thomas*[1]). Von Boletus edulis habe ich getrocknetes Material untersucht und am Fruchtträger reichliches Vorhandensein von Tryptophan in Stiel und Hut feststeller können. An frischem Material von einem nicht näherbestimmten Schimmelpilz konnte ich beobachten, daß es im Lumen der Hyphen, ohne weiter erkennbare Details, gleichmäßig verteilt zu sein scheint. Für das Vorkommen bei Algen findet sich in der Literatur keine Angabe, doch zeigte eine Probe von Spirogyra, die ich untersucht habe, daß Tryptophan, wenn auch nur in Spuren, vorhanden ist. Für höhere Pflanzen liegen Angaben über eine große Zahl von chemisch genauer erforschten Eiweißkörpern vor. Unter all diesen hat sich bisher nur ein einziger als tryptophanfrei herausgestellt, das Zein, das Prolamin des Maisendosperms; damit ist aber nicht gesagt, daß der Mais überhaupt kein Tryptophan enthält, denn andere Eiweißkörper, wie das Glutelin, enthalten es ziemlich reichlich, so daß der Gehalt des Mehles von Mais an Tryptophan nur wenig geringer ist wie bei anderen Gramineen[2]). Diese Gruppe von näher bekannten Eiweißkörpern umfaßt ausschließlich Reserveproteine aus Samen von Angiospermen, in erster Linie von Gramineen und Leguminosen, doch wurden auch untersucht Samenproteine einer Conifere (Picea), ferner von Cannabis, Gossypium, Helianthus, Cucurbita, Ricinus, Prunus amygdalus und anderer, also von Pflanzen aus den verschiedensten Familien der Angiospermen[3]). An einigen Nahrungsmitteln wurden für Tryptophan von *Fürth* quantitative Bestimmungen ausgeführt, so unter anderen am Mehl der Getreidearten, an Mais, Reis, Bohnen, an der Kartoffel und Gemüsen[2]).

Über Tryptophan als freie Aminosäure findet sich in der Literatur nur eine Angabe für Keimlinge von Lupinus albus[4]), doch ist so gut wie selbstverständlich daß bei der Keimung von Samen mit tryptophanhaltigen Reserveproteinen freies Tryptophan abgespalten wird, wenn auch die Menge des gleichzeitig vorhandenen freien Tryptophans so gering sein kann, daß es sich einem direkten Nachweis entzieht.

B. Lokalisation im Gewebe höherer Pflanzen.

Über die Lokalisation des Tryptophans im Gewebe höherer Pflanzen läßt sich im allgemeinen sagen, daß es in allen eiweißreichen Geweben reichlich zu finden ist, gleichgültig ob in Reichtum an protoplasmatischen Substanzen oder Einlagerung von Reserveproteinen der Grund dafür zu suchen ist.

Meristeme: Embryonale Gewebe, die sich vor allen anderen durch ihren Reichtum an plasmatischen und Kernsubstanzen auszeichnen, enthielten in allen untersuchten Fällen auch reichlich Tryptophan. Untersucht man Längsschnitte durch die Wurzelspitze einer wenige Tage alten Keimpflanze von Triticum oder Phaseolus, so fällt das intensive Auftreten der *Voisenet*schen Reaktion am Vegetationspunkt und oberhalb desselben auf. Weiter entfernt vom Vegetationspunkt, wo die Zellen schon in das Stadium der Streckung eingetreten sind,

[1]) *P. Thomas* und *R. Moran*, Cpt. rend. **159**, 125. 1914.
[2]) *Fürth*, l. c. 6. Mitteilung.
[3]) Eine ausführliche Zusammenstellung der Forschungsergebnisse an pflanzlichen Proteinen findet sich bei *Osborne* in *Abderhaldens* Biochem. Handlexikon.
[4]) *E. Schulze* und *Winterstein*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **45**, 38. 1905.

fällt die Reaktion im allgemeinen schwächer aus. Ein Querschnitt durch diese Zone des Streckungswachstums zeigt, daß die Exodermis und Endodermis eine intensivere Reaktion geben, während die relativ großen Zellen des Zentralzylinders eine bedeutend schwächere Färbung geben. Das Rindenparenchym gibt eine gerade noch erkennbare Reaktion.

Eine ähnliche Anhäufung von Tryptophan, wie an der Wurzelspitze, zeigt sich auch am Vegetationspunkt des embryonalen Sprosses.

Keimlinge von Gerste, Roggen oder Mais ergeben die gleichen Resultate wie die vom Weizen; Bohnenkeimlinge zeigen außerdem noch eine Anhäufung von Tryptophan an den Spitzen der Primordialblätter, die bedeutend stärker tingiert erscheinen wie die übrige Spreite.

Dauergewebe, Grundgewebe: Da das Grundgewebe im allgemeinen protoplasmaarm ist, war von vornherein zu erwarten, daß Tryptophan, nur in Spuren vorhanden, in den meisten Fällen überhaupt nicht nachweisbar ist. Bei fast allen untersuchten Pflanzen ergab auch im Grundgewebe die Reaktion ein negatives Ergebnis. Nur beim Kohl fiel die Reaktion im Protoplasma sämtlicher Grundgewebszellen des Blattstieles schwach positiv aus.

Ein abweichendes Verhalten zeigen Idioblasten, die sich durch einen auch mit anderen Reaktionen nachweisbaren Eiweißgehalt auszeichnen. Ein gutes Beispiel dafür sind die Myrosinzellen, die im Grundgewebe von Cruciferen, Resedaceen und anderen reichlich vorhanden sind; sie geben mit dem *Voisenet*schen Reagens eine intensive Violettfärbung. Im Pallisadenparenchym von Laubblättern konnte ich in einzelnen Fällen reichlichstes Vorhandensein von Tryptophan feststellen, doch sind die Beobachtungen zu unregelmäßig und zum größten Teil schon zu Beginn des herbstlichen Laubfalles ausgeführt worden, so daß es nicht möglich ist, eindeutige Beobachtungen mitzuteilen.

Durch großen Tryptophangehalt zeichnet sich in allen untersuchten Fällen das Speicherparenchym aus. Ein prinzipieller Unterschied im Tryptophangehalt zwischen dem Speichergewebe von Samen und unterirdischen Speicherorganen hat sich nicht ergeben. (Untersucht wurden die Kartoffelknolle und die Zwiebel von Leucojum.) In allen derartigen Organen hat sich ein je nach dem Eiweißgehalt reichlicheres oder geringeres Vorkommen von Tryptophan feststellen lassen. Über die Lokalisation dieser Eiweißkomponente im Endosperm der Gramineensamen läßt sich sagen, daß die Hauptmenge von Tryptophan sich nicht, wie man vermuten sollte, in der Kleberschicht findet, sondern in den an diese angrenzenden äußeren Schichten des Stärkeparenchyms, die eine etwas stärkere Reaktion geben. Nach innen zu verblaßt die Farbe der Reaktion allmählich bis zu den zentral gelegenen Gewebsteilen, in denen Tryptophan nur mehr in Spuren vorhanden zu sein scheint.

Bei den stärkereichen Samen von Leguminosen, wie auch bei mehr fetthaltigen Samen von Mandel, Lein, Ricinus u. a., hat sich die den Kotyledo einhüllende embryonale Epidermis immer als gleichmäßig tryptophanreich erwiesen, während im Innern, im eigentlichen Stärke- bzw. Fettparenchym, zwischen großen Gruppen von tryptophanhaltigen Zellen auch solche zu finden sind, die die Reaktion nur schwach oder gar nicht geben. In den meisten Fällen, besonders im großzelligen Parenchym der Leguminosensamen, dürfte diese Erscheinung auf Beschädigung einzelner Zellen beim Schneiden zurückzuführen sein, da dann ein Herauslösen der Zellinhaltsbestandteile leichter erfolgen kann. Im Samen von Prunus amygdalus und anderen Rosaceen (Pirus communis) besteht jedoch die Möglichkeit eines Zusammenhanges dieser Beobachtung mit dem Vorkommen von Emulsin, da dort zusammenhängende Gruppen von stärker reagierenden Zellen den Verlauf der Gefäßbündel begleiten.

In der Kartoffelknolle ist im Innern ein überall gleichmäßiger Tryptophangehalt nachweisbar, der gegen das Periderm zu allmählich abnimmt.

Bei fettreichen Samen ist es ratsam, die Schnitte vor der Untersuchung durch Behandlung mit Äther oder Petroläther zu entfetten, weil sonst zu großen Tropfen zusammenfließende Fettmengen die Beobachtung stören können. In stärkehaltigen Präparaten sind derartige Vorsichtsmaßregeln gegenüber der Stärke nicht geboten, da diese durch Einwirkung der Salzsäure schon in Lösung gegangen ist, bevor noch die Reaktion maximal eingetreten ist.

Hautgewebe: In der Epidermis habe ich, abgesehen von dem erwähnten Falle an embryonalen Organen, Tryptophan nicht gefunden. Eine Ausnahme machen nur die Schließzellen der Spaltöffnungen, die ja auch sonst meistens ein von dem ihrer Umgebung abweichendes Verhalten an den Tag legen[1]). In ihnen ließ sich häufig, auch bei Glashauspflanzen im Winter (Tradescantia), Tryptophan nachweisen.

Stranggewebe: Im Stranggewebe der vollkommen entwickelten Pflanze, das eine Differenzierung in Holz- und Siebteil aufweist, ist Tryptophan immer nur im Siebteil nachzuweisen, was ja auch dessen Funktion der Eiweißleitung entspricht. Daß im Siebteil der gleichen Pflanze Tryptophan manchmal reichlich vorhanden sein kann, manchmal nicht nachweisbar ist, hängt wohl mit dem eben nur zeitweilig stattfindenden Transport der Assimilate zusammen.

In den embryonalen Gefäßbündelanlagen ist Tryptophan reichlich zu finden. An Primordialblättern eines Bohnenkeimlings hebt sich das noch unausgebildete Gefäßbündelnetz durch seine intensive Färbung von der Umgebung deutlich ab, und auch die die Radicula durchziehende Gefäßbündelanlage ist in ihrem ganzen Verlaufe deutlich erkennbar.

---

[1]) *N. Hamorak*, Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss., Wien, **124**, 6 u. 7. 1915.

C. Lokalisation in der Zelle höherer Pflanzen.

Da die Reaktion bei Anwendung von Fixierungsmitteln, die ja den in diesem Falle interessierenden Indolkomplex unverändert lassen, durch eine zur Beobachtung genügend lange Zeit streng lokalisiert bleibt, so war es naheliegend auch die Inhaltskörper der einzelnen Zelle auf das Vorkommen von Tryptophan zu untersuchen. Wo Tryptophan in einer nur einigermaßen höheren Konzentration vorhanden ist, läßt sich das bei vorsichtiger Arbeitsweise auch unschwer erreichen.

Zellkern: Wenn makrochemische Untersuchungen über Nucleoproteide zum Teil auch an Pflanzen [Weizen[1]) und Hefe[2])] angestellt worden sind, so ist doch über die Zusammensetzung ihrer Eiweißkomponenten so gut wie nichts bekannt. Genauer erforschte Komponenten tierischer Nucleoproteide, die unter den Namen Histone und Protamine zusammengefaßt werden, zeichnen sich durch ihren Reichtum an Diaminosäuren aus, während Monoaminosäuren, und unter diesen wieder besonders die cyclischen, meist nur in geringfügiger Menge vorhanden sind. Es stimmt mit diesem Ergebnis der makrochemischen Forschungsrichtung gut überein, daß Tryptophan in pflanzlichen Zellkernen nur in solchen Geweben zu finden ist, die sich auch sonst als besonders tryptophanreich erwiesen haben.

Im Zentralzylinder der Wurzel eines Bohnenkeimlings sind in den schon relativ großen Zellen die Kerne deutlich an ihrer rötlichen Färbung erkennbar; mehr gegen die Wurzelspitze zu ist das noch nicht ins Streckungswachstum eingetretene Gewebe zu plasmareich, als daß die jedenfalls auch tryptophanhaltigen Kerne sich durch ihre Farbe von der ebenfalls reagierenden Umgebung abheben könnten. An jungen Wurzeln von Getreidearten und vom Kürbis läßt sich die gleiche Feststellung machen.

Ein geeignetes Objekt für den Tryptophannachweis im Zellkern ist das Stärkeparenchym der Kartoffelknolle; die tieferen stärkereichen Schichten zeichnen sich, schon makroskopisch betrachtet, durch ihren größeren Tryptophangehalt aus, während eine mikroskopische Untersuchung die tiefviolette Färbung der, von ebenfalls deutlich tingierten Protoplasmasträngen umzogenen, Kerne zeigt. Die in den äußeren stärkeärmeren, peridermalen Schichten gelegenen Kerne sind wesentlich ärmer an Tryptophan, doch ebenfalls deutlich gefärbt. An diesen Kernen, die meistens ganz frei liegen und ein besonders klares Bild geben, läßt sich feststellen, daß auch der Nucleolus Tryptophan enthält, denn wenn durch einen kleinen Fehler in der Anstellung der Reaktion, wenn z. B. nach der Formalinhärtung nicht lange genug ausgewaschen wurde,

[1]) *T. Osborne* und *Harris*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**, 85. 1902.
[2]) *A. Kossel*, Zeitschr. f. physiol Chem. **3**, 284. 1879, u. **4**, 290. 1880.

diese nicht maximal eintreten kann, so sieht man an den ungefärbten Kernen den Nucleolus deutlich, wenn auch nur schwach rötlich gefärbt. Es läßt sich aus diesem Verhalten schließen, daß der Tryptophangehalt des Nucleolus ein relativ größerer ist wie der des übrigen Kernes.

Protoplasma: Was in der Literatur über die Mikrochemie des Protoplasmas zu finden ist, bezieht sich in erster Linie auf seine Färbbarkeit und ist aus diesem Grunde nicht geeignet, einen Aufschluß über seine Zusammensetzung aus chemisch charakterisierten Bausteinen zu geben. Wenn man von einer Beobachtung *O. Löws* [1]) absieht, der bei der Untersuchung von „Plastin" durch ein positives Ausfallen der *Millon*schen Reaktion Tyrosin in dem untersuchten Präparat nachgewiesen hat, so ist von seiten der Makrochemie für ein Vorkommen von Eiweißbausteinen im Protoplasma kein Nachweis erbracht.

In den von mir untersuchten Fällen ist Tryptophan im pflanzlichen Protoplasma bisher nur in besonders eiweißreichen Geweben nachweisbar. Relativ leicht ist es im Plasma von eiweißspeichernden Endosperm- und ähnlichen Zellen zu finden. Im Lumen der großen Parenchymzellen des Kotyledo der Bohne oder einer anderen Leguminose ist der protoplasmatische Wandbelag tief violett gefärbt. Die Farbe ist in diesem Falle eine derart intensive, daß die Beobachtung von Einschlüssen des Protoplasmas bedeutend erschwert ist. Eine wenn auch nicht so starke, so doch ebenfalls schön violette Reaktion geben die schon besprochenen Zellen des Stärkeparenchyms der Kartoffelknolle. Das Protoplasma dieser Zellen gibt bei Anwendung der Formalinhärtung ein besonders klares Bild und gestattet bei stärkerer Vergrößerung sogar die Erkennung der etwas granulösen Struktur. Ob die Granula sich durch einen eventuellen Unterschied in der Intensität der Reaktion von dem sie umgebenden hyalinen Protoplasma abheben, läßt sich nicht unterscheiden.

Einschlüsse des Protoplasmas: Von den geformten Einschlüssen des Protoplasmas zeichnet sich vor allen das Aleuron durch seinen hohen Tryptophangehalt aus. Es ist mir auch bei Einhaltung sämtlicher Vorsichtsmaßregeln nicht gelungen, die Reaktion auf die in Aleuronkörnern enthaltenen Eiweißkrystalle lokalisiert erhalten zu können. Diese scheinen zu leicht löslich zu sein, um selbst nach längerer Härtung gegen die Einwirkung der konzentrierten Salzsäure resistent zu werden; auch die sonst so schön sichtbaren Eiweißkrystalle im Aleuron des Endosperms von Ricinus geben keine lokalisierte Reaktion, sondern nur eine diffuse Violettfärbung des ganzen Aleuronkornes. Im Gegensatz zu den Eiweißkrystallen des Aleuron lassen sich die frei im Protoplasma vorkommenden Eiweißkrystalle der peridermalen Schichten der Kartoffelknolle durch Behandlung mit Sublimat oder Formalin genügend

[1]) *O. Löw*, Botan. Zeitg. 1884, S. 113ff.

widerstandsfähig machen, um eine streng lokalisierte, äußerst intensive Reaktion zu geben. Ohne vorhergehende Härtung sind diese Krystalle derart leicht löslich, daß schon ein kurzer Aufenthalt in der alkalisch reagierenden Lösung von Natriumsilicat sie zu entfernen vermag.

Chromoplasten: Wenn es in vereinzelten Fällen möglich war, im Pallisadenparenchym assimilierender Laubblätter ein Vorkommen von Tryptophan festzustellen, so lassen diese Beobachtungen doch noch keinen Schluß zu auf das Vorhandensein dieser Eiweißkomponente im Chloroplastenstroma; eine streng im Chlorophyllkorn lokalisierte Reaktion bekam ich nur im Blattparenchym und in den Schließzellen von Tradescantia zebrina, und auch da war die Reaktion schwach, doch immerhin eindeutig erkennbar. Zur Erklärung dieses anscheinend überraschend geringen Vorkommens von Tryptophan im Stroma des Chloroplasten mag der Umstand dienen, daß die Untersuchungen im Spätherbst und Winter vorgenommen wurden und, mit Ausnahme von einigen gerade noch nicht vergilbten Blättern von Freilandpflanzen, mir nur Glashauspflanzen zur Verfügung standen. Bei Wiederholung der Versuche im Sommer an Pflanzen, die in voller Vegetation stehen, wird sich gewiß ein reichlicheres Vorkommen von Tryptophan in den Assimilationsorganen feststellen lassen[1]).

Auch an den Leukoplasten in der Epidermis von Tradescantia und anderen Pflanzen konnte ein positives Ausfallen der Reaktion bisher nicht beobachtet werden. Es mag auch dieser negative Befund mit der nur kümmerlichen Vegetation der Glashauspflanzen im Winter zusammenhängen.

Es sei mir gestattet, auch an dieser Stelle meinem verehrten Lehrer, Herrn Hofrat Dr. *H. Molisch*, für das stete Interesse, das er der Arbeit entgegengebracht hat, zu danken.

Zusammenfassung.

In Anlehnung an die von *Fürth* methodisch erforschte Tryptophanreaktion von *Voisenet* wurde eine Methode ausgearbeitet, um diese wichtige Eiweißkomponente auch im Gewebe lokalisiert nachweisen zu können. Das Verfahren besteht darin, daß nach Durchtränkung des Untersuchungsobjektes mit Natriumsilicat durch die konzentrierte Salzsäure des Reagens die Kieselsäure kolloidal ausgefällt wird und als eine das Präparat umhüllende, vollkommen durchsichtige Membran einen physikalischen Schutz gegen die Zerstörung der Gewebsstruktur darstellt. In Verbindung mit Eiweißfällung ließ sich die Methode auch zur Untersuchung cytologischer Details in hochkonzentrierter Salzsäure verwenden.

---

[1]) *H. Molisch*, Zeitschr. f. Botanik **8**, 124. 1916; *A. Mayer*, Flora **111**, 85. 1918; *A. Rippel*, Jahresber. d. Ver. f. angew. Bot. **16**, 3. 1918.

Mit Hilfe der derartig modifizierten Reaktion nach *Voisenet* bzw. *Fürth* wurde Tryptophan in Pflanzen aus den verschiedensten Gruppen des Systems nachgewiesen; sein Vorkommen konnte, abgesehen von schon bekannten Fällen, bei einem Schimmelpilz, dem Herrenpilz, bei einer Alge und einigen Cormophyten festgestellt werden.

In der höheren Pflanze zeichnen sich in erster Linie die embryonalen Gewebe durch großen Tryptophangehalt aus; von Dauergeweben weisen Speichergewebe und die eiweißleitenden Elemente der Gefäßbündel ein reichlicheres Vorkommen von Tryptophan auf, während es im Grund- und Hautgewebe im allgemeinen nicht nachweisbar ist.

Über das Vorkommen in Zellinhaltskörpern läßt sich sagen, daß Tryptophan in allen eiweißhaltigen Zelleinschlüssen, wie dem Kern, Nucleolus, Protoplasma, Aleuron, in Eiweißkrystallen und dem Chloroplastenstroma eindeutig nachweisbar ist.

Untersuchungen über die Volumenveränderungen der Blutkörperchen in Lösungen von verschiedenem osmotischen Druck.

III. Mitteilung.

Studien über das osmotische Verhalten der Blutkörperchen.

Von

Rich. Ege.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 4. März 1922.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Wenn die osmotische Erklärung des Blutkörperchens als *Pfeffer*sche Zelle, deren Volumen durch die osmotische Konzentration der äußeren Flüssigkeit bestimmt wird, richtig ist, müssen zwischen der osmotischen Konzentration der äußeren Flüssigkeit und den Schwellungen des Blutkörperchens ganz bestimmte quantitative Verhältnisse bestehen.

Es genügt daher natürlicherweise nicht als Beweis der osmotischen Erklärung, darzutun, daß die Blutkörperchen in Flüssigkeiten von geringerer osmotischer Konzentration als der des Plasmas schwellen und in Flüssigkeiten von höherer osmotischer Konzentration schrumpfen; man muß außerdem als entscheidendes Moment verlangen, daß die Volumenveränderungen nach ganz bestimmten Gesetzen verlaufen, die wir im folgenden betrachten werden.

Einer von *Fischers* wichtigsten Angriffspunkten gegen die osmotische Erklärung ist eben, daß der Grad des Schwellens und Schrumpfens nicht mit derjenigen Volumenveränderung übereinstimmt, die man nach der osmotischen Theorie zu erwarten hätte; *Fischers* Kritik selbst ist aber nicht viel wert; er schreibt nämlich: „With every increase in the concentration of the medium surrounding a cell we should get a proportional decrease in the volume of the cell. As a matter of fact, the shrinkage is always less than anticipated“[1]).

---

[1]) Oedema and Nephritis, S. 156.

Nun ist jedoch klar, daß *Hamburger* recht hat, wenn er behauptet, daß nicht zu erwarten ist, daß die Volumenveränderung den Änderungen des osmotischen Druckes proportional verlaufen soll; wenn *Fischers* Kritik aber auch unbegründet ist, ist es dennoch notwendig, die von *Hamburger* und *Koeppel* angeregte Frage einer Behandlung zu unterziehen. Welchen Änderungen unterliegt das Blutkörperchenvolumen in Lösungen verschiedener osmotischer Konzentration und welche Änderungen müßte es der osmotischen Theorie gemäß durchmachen? Nur wenn wir eine Übereinstimmung zwischen dem theoretischen und dem empirischen Blutkörperchenvolumen finden, dürfen wir bei der osmotischen Erklärung stehen bleiben.

Hedin und *Koeppe* waren (1895) die ersten, welche unabhängig voneinander quantitative Untersuchungen über das Volumen des Blutkörperchens in Lösungen von verschiedenem osmotischen Druck anstellten, und zwar mittels der von *Hedin* beschriebenen Hämatokritmethode.

Hedin[1]) fand, daß nur Lösungen, welche dieselbe Gefrierpunktserniedrigung aufwiesen wie das Plasma, dasselbe Blutkörperchenvolumen wie dieses ergaben. Lösungen mit niedrigerer Gefrierpunktsdepression ergaben ein größeres Blutkörperchenvolumen. Lösungen mit höherer Depression ergaben ein geringeres Blutkörperchenvolumen als das ursprüngliche.

Das quantitative Verhältnis zwischen der osmotischen Konzentration der äußeren Flüssigkeit und der Volumenveränderung läßt sich aber nicht aus *Hedins* Versuchen herleiten; das Blut und die Salzlösung werden nur zu gleichen Teilen gemischt; wenn man auch sowohl die Lösung als die osmotische Konzentration des Plasmas kennt, so kennt man doch nicht die osmotische Konzentration der äußeren Flüssigkeit nach der Vermischung. Da *Hedin* außerdem fand, daß das Volumen in verschiedenen unter sich isosmotischen Lösungen verschieden war, würde man natürlicherweise verschiedene Gesetze für den Zusammenhang zwischen dem Blutkörperchenvolumen und dem osmotischen Druck der äußeren Flüssigkeit finden, je nachdem man die eine oder die andere äußere Flüssigkeit benutzte.

Dagegen führt *Koeppe* in seinem Aufsatz aus dem Jahre 1895 eine Reihe von Zahlen an[2]), die sich sehr wohl zum Studium der Gesetze anwenden ließen, welche für die Volumenveränderungen infolge von Veränderungen der osmotischen Konzentration der äußeren Flüssigkeit maßgebend sind, worauf *Koeppe* sich aber zu dem Zeitpunkt nicht einließ.

[1]) Skand. Arch. 1895.
[2]) Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1895.

Der erste, der sich mit dieser Frage beschäftigte, war *Hamburger*[1]). Führt man ein Blutkörperchen aus einer 0,9 proz. NaCl-Lösung in eine Salzlösung von einem doppelt so großen osmotischen Druck hinüber, so könnte man erwarten, daß das Blutkörperchen, um sich mit der neuen äußeren Flüssigkeit im Gleichgewicht zu befinden, bis auf die Hälfte seines ursprünglichen Volumens einschrumpfen müßte.

Die Versuche ergaben jedoch etwas anderes; während zu erwarten war, daß das Blutkörperchen — dem *van't Hoff-Boyle-Mariotte*schen Gesetze gemäß, wenn es aus einer 0,9 proz. NaCl-Lösung in eine 1,5 proz. hinübergeführt würde, um etwa 60% einschrumpfen würde, fand *Hamburger* nur ein Schrumpfen von 17,5%. Die Erklärung hierfür ist einfach, daß das Blutkörperchen aus 2 Phasen besteht, einer dispersen (zuvörderst Hämoglobin) und dem Dispersionsmedium (Wasser).

Wenn diese Phasen in dem normalen Blutkörperchen gleich groß sind, soll das Blutkörperchen nicht von 100 bis auf 50 einschrumpfen können, wenn es aus dem Plasma in eine Flüssigkeit eines doppelt so großen osmotischen Druckes hinübergebracht wird, sondern nur von 100 bis auf 75, vorausgesetzt, daß das Häutchen keinen Widerstand gegen das Schrumpfen leistet.

Geht man davon aus, daß das Häutchen keinen Widerstand leistet, so hat man an dem Schwellen und Schrumpfen der Blutkörperchen ein Mittel zur Berechnung der dispersen Phase des Blutkörperchenvolumens und der Phase des Dispersionsmediums, wie *Hamburger* dies in der obenerwähnten Abhandlung dartut, wohl zu bemerken, falls man die Blutkörperchen als eine von einem semipermeablen Häutchen umgebene *Pfeffer*sche Zelle betrachten darf.

Hamburger drückt sich nicht ganz so aus, wie oben angeführt; er sagt (Osmotischer Druck Bd. I, S. 341): „Ich stelle mir vor, daß die Blutzelle aus einem festen Gerüst (Protoplasma) besteht, zwischen welchem die intracellulare Flüssigkeit verteilt ist. Das Protoplasma hat am Wasseranziehungsvermögen *keinen* Anteil. Es ist also nur die intracellulare Flüssigkeit, welche Quellung der Zelle durch hypisotonische und Schrumpfung durch hyperisotonische Lösungen herbeiführt.“

In späteren Abhandlungen benutzt *Hamburger* oft die Bezeichnung „Gerüstvolumen“ und scheint sie mit dem Ausdruck „Stroma“ zu parallelisieren; daß dies doch keineswegs seine Absicht ist, sondern daß er eben im großen ganzen unter dem Ausdruck „Gerüstvolumen“ dasselbe versteht, was wir nun durch die disperse Phase des Blutkörperchens bezeichnen, geht u. a. aus Osm. Druck Bd. I, S. 384 hervor, wo er von der intraglobularen Flüssigkeit und im Gegensatz dazu von Stroma und Hämoglobin redet.

---

[1]) Über den Einfluß von Salzlösungen auf das Volumen tierischer Zellen. Arch. f. Physiol. 1898.

Hamburger findet, daß die disperse Phase des Blutkörperchens (das Gerüstvolumen) bei Säugetieren um 50—55% liegt, wogegen sie beim Frosch etwa 75% beträgt.

Koeppe[1]) kritisiert *Hamburgers* Methode zur Bestimmung der dispersen Phase des Blutkörperchens in verschiedenen Beziehungen. Teils hat *Hamburger* nicht berücksichtigt, daß das Blutkörperchenhäutchen nicht absolut semipermeabel ist, sondern u. a. permeabel ist für Säureionen, teils hat er die Änderungen des Dissoziationsgrades mit der Verdünnung unberücksichtigt gelassen [oder vielmehr, da *Hamburger* auch nicht die verschiedenen Dissoziationsgrade der äußeren Flüssigkeit (NaCl) berücksichtigt, geht er davon aus, daß der Dissoziationsgrad des Blutkörpercheninhalts mit der Verdünnung in derselben Weise variiert wie NaCl]; und schließlich hat *Hamburger* auf den Widerstand keine Rücksicht genommen, den das Blutkörperchen gegen das Schwellen und Schrumpfen ausübt.

Einige von *Koeppes* Einwänden sind ohne Zweifel berechtigt und zu denselben muß man noch einen Einwand hinzufügen, den *Hamburger* selbst erörtert, nämlich daß er nicht das absolute, sondern nur das relative Blutkörperchenvolumen bestimmt, indem die Zentrifugierung nicht hinreichend lang und kräftig ist. *Hamburger* behauptet jedoch, daß es von keinem besonderen Einfluß auf seine Resultate ist, ob sich zwischen den Blutkörperchen etwas mehr oder weniger Plasma befindet. Er ist aber nicht darüber im klaren, daß sich leicht systematische Fehler einstellen; zentrifugiert er z. B. etwa $^1/_2$ Stunde bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 3000 mal, kann er eventuell die Blutkörperchen in hypotonischen Lösungen quantitativ niederschlagen, während dies mit den geschrumpften Blutkörperchen keineswegs der Fall ist.

Schließlich kommen wir meiner Ansicht nach zu dem großen Unbekannten: Ist das Blutkörperchenvolumen durch den osmotischen Druck der äußeren Flüssigkeit nach dem *Boyle-Mariotte*schen Gesetz bestimmt?

Man wird leicht einsehen, daß man, wenn man von der Richtigkeit der osmotischen Theorie ausgeht, das Volumen der dispersen Phase bestimmen kann, wenn man als äußere Flüssigkeit eine Lösung benutzt, deren Moleküle und Ionen nicht in das Blutkörperchen hineindringen können (sollten einige von den Bestandteilen des Blutkörpercheninhalts hinausdiffundieren können, so müssen sie von vornherein gewaschen werden):

I. Wenn das Blutkörperchenhäutchen keinen Widerstand leistet,

II. und die Variationen des Dissoziationsgrades mit der Verdünnung bekannt sind.

---

[1]) *Koeppe*, Arch. f. Physiol. 1899.

Kennt man umgekehrt das Volumen der dispersen Phase und die Variation des Dissoziationsgrades mit der Verdünnung, kann man natürlicherweise die Methode zur Untersuchung des Widerstandes des Blutkörperchenhäutchens gegen Schwellung und Schrumpfung benutzen; ursprünglich war es auch meine Absicht, die Methode nur dazu zu benutzen[1]). — Andererseits könnte man untersuchen, ob die Volumenveränderungen des Blutkörperchens durch das *Boyle-Mariotte*sche Gesetz bestimmt sind, und in der Weise den entscheidenden Beweis für oder gegen die osmotische Auffassung des Blutkörperchenvolumens und dessen Variation mit der osmotischen Konzentration der äußeren Flüssigkeit finden, wenn man I. das Volumen der dispersen Phase, II. die Variation des Dissoziationsgrades, III. den Widerstand des Häutchens gegen Schwellung und Schrumpfung kennt.

Die beiden ersten Unbekannten können teilweise auf einem anderen Wege bestimmt werden; dennoch wird die Untersuchung 2 Unbekannte enthalten; man braucht sie deswegen aber doch nicht aufzugeben; teils haben die Gefrierpunktsdepressionsbestimmungen gezeigt, daß der Widerstand des Blutkörperchenhäutchens gering ist (vielleicht macht das Häutchen keinen Widerstand)[1]), teils können wir folgendermaßen räsonnieren: Macht das Häutchen Widerstand gegen das Schwellen, so kann das Blutkörperchenvolumen sich als etwas kleiner als berechnet herausstellen (viel kleiner kann es nicht sein, denn dann müßte die osmotische Konzentration des Blutkörpercheninhalts bedeutend geringer sein als die der äußeren Flüssigkeit bei Hypertonie, was man in dem Falle durch Gefrierpunktsdepressionsuntersuchungen müßte kontrollieren können); macht das Häutchen gleichfalls Widerstand gegen die Schrumpfung, wird man ein etwas größeres Volumen finden als berechnet, aber nie umgekehrt.

Die erste vorliegende Aufgabe ist die Bestimmung des Volumens der dispersen Phase. Am einfachsten wäre es, eine Trockensubstanzbestimmung vorzunehmen, aber wir besitzen keine Garantie dafür, daß wir daran ein tatsächliches Maß für die disperse Phase oder das Volumen des Dispersionsmediums vor uns haben.

Es ist möglich, daß ein Teil der Wassermenge, die bei einer gewöhnlichen Wasserbestimmung gefunden wird, als Hydratwasser o. dgl. chemisch gebunden ist. In dem Falle ist das Volumen der dispersen Phase größer als das durch die Trockensubstanzbestimmungen gefundene. Das Volumen der dispersen Phase habe ich in verschiedenen Weisen zu bestimmen gesucht, von denen hier nur die folgende angeführt werden soll: Löst man eine bestimmte Menge Nicht-Elektrolyt (z. B. Rohrzucker) in 100 Teilen Wasser, erhält man eine Lösung von ganz bestimmter Gefrierpunktsdepression; löst man in derselben Weise

---

[1]) *Rich. Ege*, diese Zeitschr. 115. 1921.

Rohrzucker in Blutkörperchensaft, verteilen die Zuckermoleküle sich nicht über 100 ccm, sondern über $100 \div x$, wo x das Volumen der dispersen Phase bezeichnet.

Die Gefrierpunktsdepression wird daher größer sein als in H_2O; wird der Gefrierpunkt des Blutkörperchensaftes vor und nach dem Zusetzen des Stoffes bestimmt, so läßt das Volumen der dispersen Phase sich berechnen.

Versuch 1: Rinderblut 0,2 proz. NaFl. Die Blutkörperchen werden abzentrifugiert, mit Sand gerieben und mit Kieselgur gepreßt.

Die Δ des Blutkörperchenpreßsaftes = 0,714. Spezifisches Gewicht 1,098. 40 ccm Blutkörperchensaft + 8 g Rohrzucker = 8 g in 44 g Blutkörperchensaft.

$$\begin{array}{rl} & \Delta = 2{,}523 \\ & \div \;\; 0{,}714 \\ \hline \text{Steigerung der} & \Delta = 1{,}819^\circ. \end{array}$$

Zum Vergleich dient, daß 8,00 g Rohrzucker in 40 ccm H_2O $\Delta = 1{,}223$ ergibt[1]), was in der Tat 8,57 g Rohrzucker in 40 ccm H_2O gelöst entspricht.

Das Volumen der dispersen Phase wird dann folgenderweise berechnet.

$$\frac{8{,}57}{44 \div x} = \frac{30{,}55}{100},$$

wo x die disperse Phase in Gramm per 44 g Blutkörperchensaft bezeichnet; 30,55% beträgt die Rohrzuckerkonzentration, die der gefundenen Steigerung der Gefrierpunktsdepression des Blutkörperchensaftes nach Zusatz von Rohrzucker entspricht; x ist = 16, d. h. 36% (Gewichtsprozent).

Disperse Phase	Dispersionsmedium	
36	64%	(Gewichtsprozent)
30	70	(Volumenprozent)

Die direkte Trockensubstanzbestimmung ergab:

	Trockensubstanz	Wasser
Gewichtsprozent	34	66
Volumenprozent	28	72

Das Volumen der dispersen Phase läßt sich leichter und vielleicht eben so korrekt aus der folgenden Formel berechnen:

$$(100 \div x) \cdot 1{,}819 = 100 \cdot 1{,}223$$
$$x = 30{,}6 \text{ Volumenprozent}$$
$$\text{Wasserphase} = 69{,}4 \quad \text{,,}$$

Das Volumen der dispersen Phase ergibt sich also als 8,7% größer als nach der gewöhnlichen Trockensubstanzbestimmung. Diese Methode leidet jedoch an einer gewissen Unsicherheit; es wird ja nämlich vorausgesetzt, daß der zugesetzte Stoff sich nur in der Wasserphase löst (und daß diese keinen Einfluß auf die Dissoziation und die Hydratation ausübt), was aber natürlicherweise keineswegs gegeben ist.

[1]) Nun sollte ein 20 proz. Rohrzucker allerdings nur eine Gefrierpunktserniedrigung von etwa 1,10 haben; der gefundene Wert liegt also um etwa 10 % zu hoch, was von Verunreinigung durch kleinere Moleküle, wahrscheinlicherweise Elektrolyten, herrühren muß, was das Räsonnement kaum beeinflussen wird.

Wir erhalten nur eine Art von Bestimmung des Volumens, in welchem der zugesetzte Stoff gelöst wird. Stellt man den gleichen Versuch und die gleiche Berechnung mit Harnstoff an, findet man ein „Wasservolumen" von 84%. Die obengenannten Versuche wurden zu einem doppelten Zweck angestellt: teils wollte ich die disperse Phase kennenlernen, um zu entscheiden, ob das Schwellen und Schrumpfen der Blutkörperchen mit der berechneten Volumenveränderung übereinstimmt, teils wollte ich auch eine Maßgabe dafür gewinnen, welcher Konzentrationsunterschied zwischen der Blutkörperchenphase und einer wässerigen Lösung eines Nicht-Elektrolyten bestehen muß, für den das Blutkörperchenhäutchen permeabel ist, wenn ein Diffusionsgleichgewicht erzielt worden ist.

Was man auch von den angewandten Methoden als Mittel zur Auffindung des Volumens der dispersen Phase sagen mag, so kann man wohl kaum davon abkommen, daß der letzte Versuch eine eindeutige Bestimmung davon gibt, welche Konzentration ein Kohlenhydrat (hier Rohrzucker) in der wässerigen Lösung und im Blutkörperchenpreßsaft haben muß, damit ein Tensionsgleichgewicht vorliegen kann.

Der Versuch sagt, daß die Konzentration im Blutkörperchensaft zur Konzentration in der äußeren Flüssigkeit sich ungefähr wie die Wassermenge im Blutkörperchensaft zur Wassermenge in der äußeren Flüssigkeit verhalten muß.

Ist die Verteilung eine andere, so kann kein Tensionsgleichgewicht vorhanden sein. Da diese Untersuchung ursprünglich angestellt wurde, um eine Erklärung der Verteilung der Glucose zwischen Blutkörperchen und Plasma zu finden (siehe diese Zeitschr. **111**. 1920; **114**. 1921), hätte der Versuch natürlicherweise mit Glucose und nicht mit Rohrzucker und sowohl mit Menschenblut wie mit sonstigem Blut angestellt werden sollen. Es fragt sich nur, ob dieses Gesetz auch für die Verteilung der Glucose zwischen Plasma und Blutkörperchen gelten wird, falls das Blutkörperchenhäutchen für Glucose permeabel ist. Dies wird sicherlich nur der Fall sein, wenn die Masse der Häutchenphase (worin die Glucose in dem Falle löslich sein muß) als verschwindend klein beobachtet werden kann. Wenn die obenstehende Gleichung nicht nur von der Verteilung zwischen dem Blutkörperchensaft und der einfachen wässerigen äußeren Flüssigkeit, sondern auch für Blutkörperchen und Plasma gelten soll, muß man gleichfalls erwarten, daß die Verteilung zwischen einer einfachen wässerigen Flüssigkeit und dem Plasma, durch eine Wand getrennt, die nur die betrachteten Stoffe passieren ließe, dasselbe Gesetz befolgen müßte.

Inwiefern dies der Fall ist, können wir nach einigen von *Hedin* herrührenden Bestimmungen berechnen. Er löst Traubenzucker in Wasser und Plasma und erhält folgende Werte für die molare Gefrierpunktserniedrigung (Gramm pro Liter):

Wasser	Plasma	Prozentische Diff.
0,203	0,209	+ 3,0
0,198	0,212	+ 7,1
0,193	0,215	+ 11,4
0,198	0,201	+ 1,5
0,195	0,199	+ 1,1
0,191	0,198	+ 3,7
		4,7%

Die Ursache der höheren Depression im Plasma ist sicherlich in dem Umstand zu suchen, daß die Zuckermoleküle sich hier in der Tat nicht auf 1 Liter verteilen, sondern daß der wahre Raum etwa 5% niedriger liegt, eine Annahme, die einigermaßen mit den gewöhnlichen Trockensubstanzbestimmungen übereinstimmt, die in der Regel einen Gehalt an festen Stoffen von etwa 6—7% ergeben.

Nachdem man das Volumen der dispersen Phase mit einiger Genauigkeit kennengelernt hat, kann man berechnen, welchen Volumenveränderungen ein Blutkörperchen der osmotischen Theorie gemäß unterliegen soll, falls sich die Dissoziationsverhältnisse nicht verändern und das Blutkörperchenhäutchen keinen Widerstand gegen die Volumenveränderungen leistet.

Hat ein Blutkörperchen das Volumen v, wenn der osmotische Druck der äußeren Flüssigkeit p beträgt, so wird sein Volumen in einer Flüssigkeit des osmotischen Druckes p_1 durch folgende Formel bestimmt sein

$$(v - x)\,p = (v_1 - x)\,p_1$$

wo x das Volumen der dispersen Phase bezeichnet.

Bevor wir zu den experimentellen Bestimmungen übergehen, können wir die Volumenveränderungen berechnen und graphisch aufzeichnen, welchen eine von einer absolut semipermeablen Membrane mit unendlich kleinem Elastizitätskoeffizienten umgebene und eine nichtdissoziable Verbindung enthaltende Blase in Flüssigkeiten von verschiedenem osmotischen Druck unterworfen sein wird, wenn ihre disperse Phase bzw. 30, 35 und 40% vom Volumen beträgt. Der praktischen Verwendbarkeit der Kurven wegen können wir das Volumen = 100 setzen, wenn die Gefrierpunktserniedrigung der Flüssigkeit 0,60 beträgt.

		Disperse Phase		
Δ	relative Δ	30 Volumen	35 Volumen	40 Volumen
0,60	100	100	100	100
0,80	133,3	82,5	83,7	85
1,00	166,8	72,0	74	76
1,20	200	65,0	67,5	70
1,50	250	58,0	61,1	64
0,50	83,3	114	113	112
0,40	66,7	135	132,3	130
0,35	58,3	150	146,3	143
0,30	50,0	170	166	160

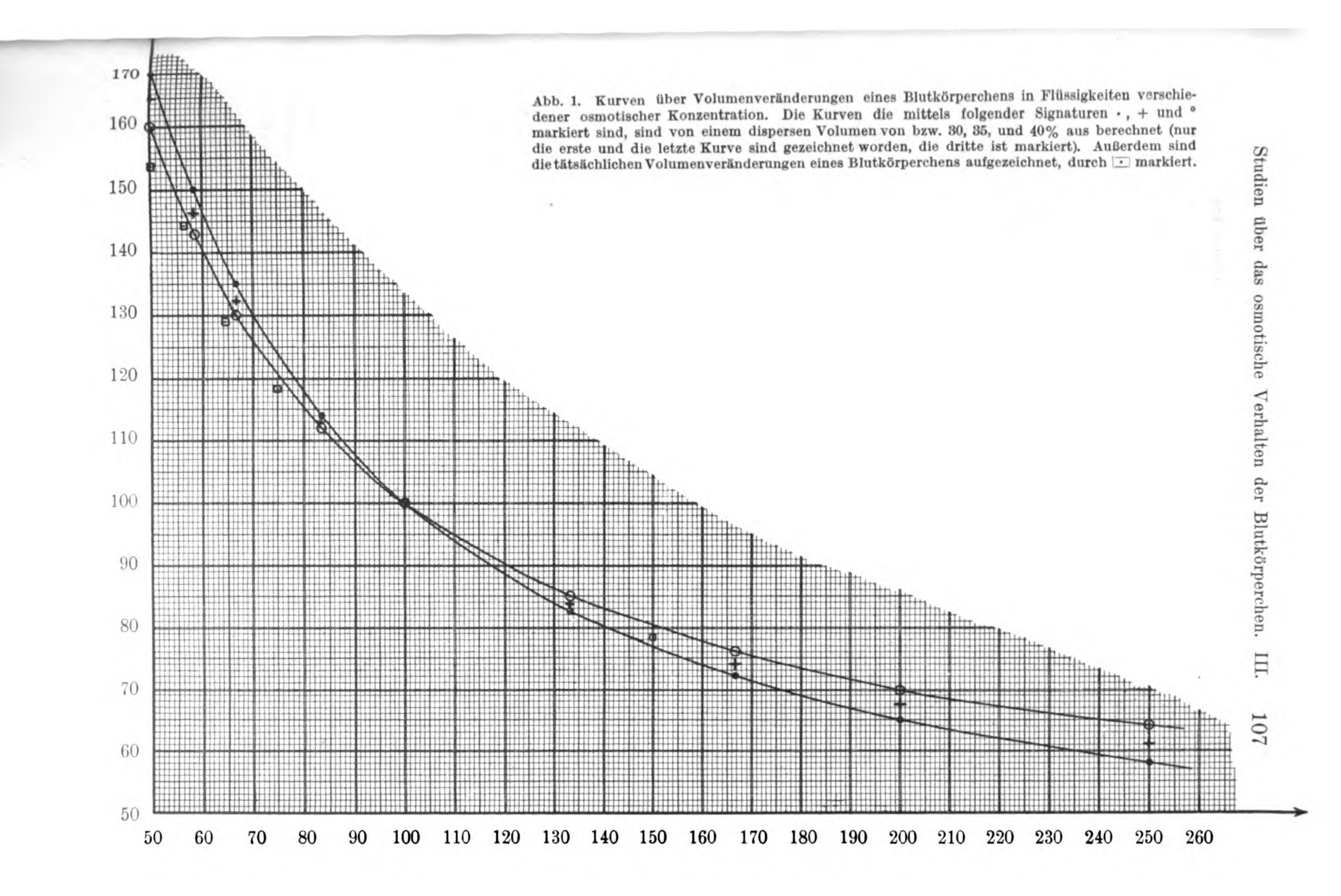


Abb. 1. Kurven über Volumenveränderungen eines Blutkörperchens in Flüssigkeiten verschiedener osmotischer Konzentration. Die Kurven die mittels folgender Signaturen ·, + und ° markiert sind, sind von einem dispersen Volumen von bzw. 30, 35, und 40% aus berechnet (nur die erste und die letzte Kurve sind gezeichnet worden, die dritte ist markiert). Außerdem sind die tätsächlichen Volumenveränderungen eines Blutkörperchens aufgezeichnet, durch ⊡ markiert.

. In einer Reihe von Fällen habe ich die Volumenveränderung in Chlorid- und Nitratlösungen untersucht. Diese Bestimmungen, welche zeigten, daß die Blutkörperchen ungefähr in dem Grade schwollen und schrumpften, wie die Größe der Wasserphase gemäß zu erwarten war, werde ich hier nicht näher besprechen, da sie an der Unsicherheit leiden, daß das Blutkörperchenvolumen in diesen Lösungen nicht konstant bleibt[1]). Da das stattfindende Schwellen bei den verschiedenen Konzentrationen der äußeren Flüssigkeit verschieden sein muß, und da bei den verschiedenen Proben die Zeit, in der das Schwellen stattgefunden haben kann, verschieden ist — am längsten dauerte es bei einer hypertonischen äußeren Flüssigkeit — eignen diese Bestimmungen sich nicht zur Lösung der aufgestellten Frage.

Um recht zu gehen, muß man vergewissert sein, daß zwischen der äußeren Flüssigkeit und dem Blutkörpercheninhalt keine Auswechslung stattfindet; ich wählte daher zur äußeren Flüssigkeit Rohrzucker, da man von diesem Stoff weiß, daß er nicht in das Blutkörperchen eindringt.

Wenn ich behaupte, daß zwischen den Blutkörperchen und der äußeren Rohrzuckerflüssigkeit keine Ausgleichung stattfindet, ist dies jedoch nicht ganz korrekt; erstens wird die Menge NH_4-Salze, Harnstoff und eventuell andere diffusible Stoffe, die in den Blutkörperchen vorhanden sind, auswandern; es sind dies jedoch so kleine Mengen, daß es keine Bedeutung für das Blutkörperchenvolumen erhält; außerdem liegen aber Bestimmungen vor, welche zeigen, daß die Blutkörperchen Elektrolyte verlieren, wenn sie zu wiederholten Malen mit Rohrzucker oder anderen Anelektrolytenlösungen gewaschen werden.

Ich kann hier auf *Calugareanu* und *Henri*[2]) verweisen; diese Forscher finden, daß das Leitungsvermögen der hämolysierten Blutkörperchen abnimmt, wenn die Blutkörperchen zuvor mit Rohrzuckerlösungen gewaschen werden — Versuche, deren Richtigkeit ich durch Leitungsvermögensbestimmungen an den Rohrzuckerlösungen kontrolliert habe, mit denen die Blutkörperchen gewaschen wurden; hier fand sich nämlich in dem Waschwasser ein geringes, aber deutliches Leitungsvermögen. Wie man die obengenannten Versuche erklären soll, davon kann ich keine begründete Meinung haben; was aber in diesem Falle das Entscheidende ist, ist der Umstand, daß die Blutkörperchen in der Rohrzuckerlösung im Gegensatz zu Chlorid- und Nitratlösungen praktisch gesprochen ihr Volumen längere Zeit hindurch unverändert bewahren. Hier kann es sogar kaum nützen, die in ähnlichen Fällen von *Hamburger* aufgestellte Erklärung in Anspruch zu nehmen, daß die Ausgleichung

---

[1]) *Rich. Ege*, diese Zeitschr. **115**. 1921.
[2]) Comptes rendues Soc. Biol. **54**. 1902.

in osmotischen Verhältnissen stattfindet[1]); denn, was den Rohrzucker betrifft, scheint infolge der Literatur gegeben zu sein, daß er nicht in das Blutkörperchen eindringt, und nur die äußere Flüssigkeit enthält Rohrzucker (sowie CO_2). Ein langsames Hinausdiffundieren spricht eigentlich nicht gegen die osmotische Theorie. Was die Glucose betrifft, scheint gleichfalls aus meinen früher genannten Analysen hervorzugehen, daß sie nicht in das Blutkörperchen von den meisten Tieren[2]) eindringt; trotzdem zeigen die Leitungsvermögensbestimmungen, daß Elektrolyte ausgewandert sein müssen. Es liegt hier eine Schwierigkeit vor, und es gibt deren noch mehr, die sich nicht leicht nach der osmotischen Theorie erklären lassen; da diese Theorie jedoch in bei weitem den meisten Fällen die beste — ja oft die einzig mögliche — Erklärung der Erscheinungen abgibt, glaube ich, daß man bei der Erklärung stehen bleiben darf, daß es nicht die Theorie ist, die verkehrt ist, sondern daß es nur unsere Kenntnisse einer Reihe sekundärer Verhältnisse sind, die noch höchst mangelhaft sind.

Wenn die Blutkörperchen in der Rohrzuckerlösung ihr Volumen behalten, glaube ich, daß es berechtigt ist, das Blutkörperchen als eine von einem den betreffenden Stoffen gegenüber semipermeablen Häutchen umgebene *Pfeffer*sche Zelle zu betrachten, weshalb wir nun zu der Untersuchung übergehen, ob die Schwellung und Schrumpfung das *Boyle-Mariotte*sche Gesetz befolgt.

Kaninchenblut. (Oxalat.) Volumenveränderungen in Rohrzuckerlösungen verschiedener Konzentration.

150 g Rohrzucker + 1000 ccm H_2O: die übrigen Lösungen wurden durch Verdünnungen dieser Lösung hergestellt.

Rohrzuckerlösung.

Konzentr.	relativ. Konz.	Volumen	relativ. Volumen
10%	100	1477	100
15	150	1163	78,3
7,5	75	1744	118,2
6,43	64,3	1906	120,0
5,62	56,2	2135	144,3
5,00	50,0	2207	153,8 leichte Häm.

[1]) Weshalb die Ausgleichung zwischen den Blutkörperchen und der äußeren Flüssigkeit in osmotischen Verhältnissen stattfinden soll — eine Erklärung, auf die *Hamburgers* ganze Auffassung der isotonischen Koeffizienten allmählich aufgebaut worden ist — kann ich mir durchaus nicht erklären, sobald sowohl Anionen als Kationen (sowie eine Reihe Anelektrolyte) durch das Blutkörperchenhäutchen zu dringen vermögen. Die einzige Erklärung, die ich mir denken könnte, ist, daß alle Stoffe — inklusive Wasser — gleich schnell diffundieren, oder auch, daß das Blutkörperchenhäutchen gegen das Schwellen und Schrumpfen einen so großen Widerstand leistet, daß die Verschiedenheiten der Diffusionsgeschwindigkeiten durch die entstehenden hydrostatischen Druckverhältnisse geschmälert und ausgeglichen werden, aber keins von beiden ist der Fall.

[2]) *Rich. Ege*, diese Zeitschr. **111**. 1920; **114**. 1921.

Um zu untersuchen, ob diese Volumenveränderungen mit dem *Boyle-Mariotte*schen Gesetz übereinstimmen, müssen wir das Volumen der dispersen Phase bestimmen, welche Bestimmung vorläufig durch eine einfache Trockensubstanzbestimmung (bei 100—110°) ersetzt wird.

Der Trockensubstanzgehalt der Blutkörperchen in 10% Rohrzucker betrug 39,6 Gewichtprozent; daraus lassen sich folgende Volumenprozentsätze berechnen:

35,3% Trockensubstanz 64,7% H_2O[1])

Könnte man davon ausgehen, daß wir hier ein Maß der dispersen Phase vor uns haben, so können wir die gefundenen Volumenveränderungen mit denjenigen Volumenveränderungen vergleichen, die sich nach dem *Boyle-Mariotte*schen Gesetz berechnen lassen, und zwar von der Voraussetzung aus, daß die Blutkörperchen etwa 35% Trockensubstanz enthielten. Nun ist, wie wir sahen, das Volumen der dispersen Phase etwa 10% größer als das durch die Trockensubstanzbestimmung gefundene; das Volumen der dispersen Phase muß also zwischen 35 und 40% liegen.

Vergleichen wir nun die gefundenen und die berechneten Volumenveränderungen, was sich am leichtesten graphisch bewerkstelligen läßt (siehe Kurve S. 7), so sieht man, daß die Blutkörperchen in hypotonischen Lösungen (unter 10% Rohrzucker) schwellen, als wenn sie zwischen 40 und 50% disperse Phase enthielten. Die Schwellung stimmt also nahezu mit der Berechnung überein; da das Volumen der dispersen Phase kaum 40% übertrifft, kann man daraus schließen, daß das Häutchen gegen das Schwellen Widerstand leistet, daß dieser Widerstand aber nur gering ist. In hypertonischen Flüssigkeiten schrumpft das Blutkörperchen, als wenn das Volumen der dispersen Phase nur 35% ausmachte (also dem Trockensubstanzgehalt gleich wäre).

Es gibt jedoch ein einzelnes Moment, das wir bisher außer acht gelassen haben — nämlich die Dissoziationsverhältnisse. In der obenstehenden Berechnung wurde keine Rücksicht genommen auf die Veränderung, welche der Dissoziationsgrad bei der verschiedenen Verdünnung und Konzentration des Blutkörpercheninhaltes durchmacht; welchen Einfluß Veränderungen des Dissoziationsgrades haben werden, das können wir teilweise durch Räsonnemente feststellen, jedoch müssen wir uns erinnern, daß wir uns auf einem etwas unsicheren Boden befinden, solange wir die Variation des „Dissoziationsgrades" in betreff

[1]) Der Volumenprozentsatz wird nach einem spezifischen Gewicht der Blutkörperchen von 1,08 berechnet; das spezifische Gewicht wurde in diesem Falle nicht bestimmt, wohl aber in einer Reihe von anderen Fällen; es schwankte zwischen 1,08 und 1,09.

des Blutkörpercheninhaltes nicht kennen[1]). Ändert sich der „Dissoziationsgrad“ nach den gewöhnlichen Regeln, indem er bei Verdünnung größer, bei Konzentration kleiner wird, so kann man daraus schließen, daß das Blutkörperchen in hypertonischen Lösungen nicht so stark schrumpfen wird, wie zu erwarten war, während die Schwellungen in hypotonischen Lösungen dagegen größer sein werden, als zu erwarten war. Es fragt sich nur, ob diese Veränderungen so bedeutend sind, daß sie auf die Volumenveränderungen einen wesentlichen Einfluß ausüben können oder nicht. Um einen Begriff davon zu gewinnen, können wir untersuchen, welche Variationen der Dissoziationsgrad bei einer NaCl-Lösung innerhalb des Konzentrationsgebietes durchmacht, das der osmotischen Konzentration des Blutkörpercheninhaltes in verschiedenen Schwellungs- und Schrumpfungsgraden entspricht.

NaCl-Konz.[2])	Δ	relative Δ[3])	α	α relativ
0,2406%	0,1453	24	91	106
0,4887	0,2897	50	87	101,5
0,690	0,4077	67	87	101,5
1,479	0,8615	143	83,5	96,5

Daraus folgt, daß der Dissoziationsgrad bei einer Verdünnung von 100%, also im Falle der stärksten anwendbaren Verdünnung, nur um etwa 2% zunehmen wird, während er bei einer Steigerung der Konzentration von 50% etwa 4% sinken wird.

Vergleichen wir die gefundenen Volumina mit den direkt berechneten unter Voraussetzung einer dispersen Phase von 35% und 40%, so erhalten wir folgende Abweichungen:

35% disperse Phase	*Blutkörperchenvol.*				40% disperse Phase	*Blutkörperchenvol.*		
Konz.	berechn.	gefund.	Abw.		Konz.	berechn.	gefund.	Abw.
150	78,3	78,3	0,0		150	80,0	78,3	÷ 1,0
75	121,7	118,2	÷ 3,5		75	120,0	118,2	÷ 1,8
64,3	136,0	129,0	÷ 7,0		64,3	133,3	129,0	÷ 4,3
56,2	150,8	144,3	÷ 6,5		56,2	146,7	144,3	÷ 2,4
50,0	165,0	153,0	÷ 12,0	Häm.	50,0	160,0	153,0	÷ 7,0

Nun ist kaum zu bezweifeln, daß die letzte Serie die richtige ist; der Trockensubstanzgehalt betrug 35,3 Volumenprozent; dazu kommen noch, wie wir sahen, etwa 10% Hydratwasser, so daß das wahre Volumen der dispersen Phase recht nahe bei 40 Volumenprozent liegen muß; man wird doch gleich fragen, wie es denn zugeht, daß das Blutkörperchen

---

[1]) Es ist natürlicherweise nicht ganz korrekt, die Begriffe Dissoziationsgrad und Schwankung des Dissoziationsgrades bei einem so komplexen System wie Blutkörpercheninhalt zu benutzen; was ich kennen zu lernen wünsche, ist die Änderung der osmotischen *aktiven* Komponenten mit der Konzentrationsveränderung.

[2]) Aus *Landolt* und *Boernstein*, 4. Aufl. 1912.

[3]) $\Delta = 0{,}60° = 100$; der Dissoziationsgrad wird hier etwa 85,5 betragen.

mehr schrumpfen kann als berechnet — der Unterschied ist allerdings nicht groß, da aber Doppelbestimmungen stattfanden, übertrifft er jedenfalls den Versuchsfehler. Die Erklärung liegt sicherlich darin, daß die Berechnung unter der Voraussetzung ausgeführt wurde, daß die Anzahl von Molekülen und Ionen sich der Verdünnung proportional ändert, was sicherlich nicht der Fall ist; wenn die Abweichungen von dieser proportionalen Verschiebung von derselben Größenordnung sind wie bei einer NaCl-Lösung, so wird das eben bewirken, daß das Blutkörperchen etwas mehr als berechnet schrumpfen muß; aus der Kurve kann man schließen, daß die Blutkörperchen etwa um 2% mehr schrumpfen werden als berechnet.

Andererseits sollte eine Steigerung des „Dissoziationsgrades" mit der zunehmenden Verdünnung ein kräftigeres Schwellen bewirken als berechnet. Da die gefundenen Schwellungen kleiner sind als die berechneten, folgt daraus, daß das Blutkörperchenhäutchen gegen das Schwellen einen geringen Widerstand leistet, wogegen es gegen das Schrumpfen keinen Widerstand zu leisten scheint.

Von anderen Versuchen führe ich nur einen Versuch mit Rinderblut an. Eine gewöhnliche Trockensubstanzbestimmung ergab 33% Trockensubstanzvolumen, nach welcher Bestimmung man die disperse Phase des Blutkörperchens zu etwa 37% veranschlagen muß, während eine Berechnung 39% ergibt; ein Hämatokritversuch ergab nämlich:

$$5{,}87\%\ \text{Glucose} = 100$$
$$3{,}76\%\ \text{Glucose} = 134{,}2$$
$$5{,}87\ (100 : x) = 3{,}76\ (134{,}2 : x)$$
$$x = 39.$$

Diese Übereinstimmung ist als einigermaßen gut zu bezeichnen; sie deutet jedoch in derselben Richtung: das Häutchen muß gegen die Volumenveränderung einen gewissen geringen Widerstand leisten.

Im großen ganzen kann man indessen behaupten, daß die Volumenveränderungen des Blutkörperchens in Flüssigkeiten verschiedener osmotischer Konzentration das *Boyle-Mariotte*sche Gesetz $p_o V_o = p_1 V_1$ befolgen; die kleinen Abweichungen, welche vorkommen, rühren sicherlich von Änderungen des „Dissoziationsgrades" und dem Widerstand des Blutkörperchenhäutchens gegen das Schwellen her. Wir haben also dargetan, daß die Volumenveränderungen des Blutkörperchens sich nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ nach der osmotischen Konzentration der äußeren Flüssigkeit richten, was in hohem Grade die osmotische Theorie befürwortet, die sich nicht mit der von *Moore*, *Roaf* und *Fischer* behaupteten kolloidchemischen Theorie in Übereinstimmung bringen läßt.

Worauf beruht denn *Fischers* und *Roafs* Behauptung, die eben besagt, daß die Blutkörperchen in Lösungen von geringerer bzw. größerer

osmotischer Konzentration als der des Plasmas zwar schwellen und schrumpfen, daß aber das Schwellen quantitativ durchaus nicht mit demjenigen übereinstimmen wird, was nach der osmotischen Theorie zu erwarten wäre, weshalb diese sich ihrer Ansicht nach nicht den Volumenveränderungen der Blutkörperchen gegenüber anwenden läßt und daher durch die kolloidchemische Theorie ersetzt werden muß? Es nimmt wunder, zu sehen, daß weder *Fischer* noch *Roaf* diese Behauptung auf irgendwelche Versuche stützen, sondern beide nur *Hamburgers* (und sonstige) Messungen anwenden und daraus finden, daß das Volumen des Blutkörperchens nicht der osmotischen Konzentration der äußeren Flüssigkeit proportional schwankt. *Roaf*[1]) stellt folgendes Rechenstück auf (die Zahlen sind *Hamburger* entlehnt): in 0,9 proz. NaCl beträgt das Blutkörperchenvolumen 41, in einer NaCl-Lösung mit einem osmotischen Druck von 0,2720 mm Hg ist es 50,2; geht man davon aus, daß der Blutkörperchengehalt ursprünglich mit 0,9 proz. NaCl „isotonisch" war, so kann man aus dem Schwellen — unter der Voraussetzung, daß nur Wasser durch das Häutchen dringt, und daß die Dissoziation eine vollständige ist — berechnen, daß der osmotische Druck des Blutkörperchengehaltes nach dem Schwellen 4170 mm Hg beträgt; da die osmotische Konzentration der äußeren Flüssigkeit 2720 mm Hg ausmacht, müßte das Blutkörperchenhäutchen einem Überdruck von 1350 mm Hg (etwa 2 Atm.) standhalten können.

Roaf meint, daß dies nicht möglich sei, und ist daher geneigt, anzunehmen, daß NaCl durch das Blutkörperchenhäutchen zu dringen vermag. Das Räsonnement ist durchaus verfehlt; sowohl *Fischers* als *Roafs* Irrtum beruht einfach auf dem Umstand, daß sie das Volumen der dispersen Phase unberücksichtigt lassen, obschon *Hamburger*, dem die Zahlen entlehnt sind, eben behauptet, daß man die proportionale Volumenveränderung nicht erwarten kann. Des „Schattenvolumens" wegen läßt sich die Gleichung $p_o V_o = p_1 V_1$ (1) nicht direkt anwenden, sondern muß durch

$$p_o (V_o \div x) = p_1 (V_1 \div x) \quad (2)$$

ersetzt werden, wo x das Schattenvolumen bezeichnet.

Hamburger gebraucht eben die beobachteten Volumenveränderungen zur Berechnung des „Schattenvolumens"; allerdings findet er verschiedener Umstände wegen zu große Werte des „Schattenvolumens", etwa 55%; es ist aber nicht zu bezweifeln, daß *Hamburgers* Räsonnement berechtigt ist; wir sahen ja gerade, daß die gefundenen und die (nach 2) berechneten Volumenveränderungen, wenn man das Volumen der dispersen Phase in anderer Weise ermittelt, so gut übereinstimmen, wie man es verlangen kann. Vergleicht man dagegen die Volumen-

[1]) Amer. Journ. of Physiol. **20**. 1907—08.

veränderungen der Blutkörperchen in Flüssigkeiten verschiedener osmotischer Konzentration mit den von *Fischer* gefundenen Zahlen des Schwellens und Schrumpfens von Fibrin (oder anderen Kolloiden), so ist es auch bei dem besten Willen unmöglich, eine Übereinstimmung ausfindig zu machen.

Moore und *Roaf* sind geneigt, Schwankungen des osmotischen Druckes der Kolloide (des Hämoglobins) als die wesentliche Ursache der Volumenveränderungen zu betrachten; diese Auffassung, die vielleicht der *Fischer*schen „Quellungs"-Theorie identisch ist, scheint die Verhältnisse durchaus nicht erklären zu können, denn teils haben isosmotische Lösungen namentlich von Elektrolyten und Nichtelektrolyten einen weit verschiedenen Einfluß auf den osmotischen Druck der Kolloide, teils üben ganz verschiedene Konzentrationen desselben Salzes einigermaßen denselben Einfluß auf die osmotische Konzentration der Kolloide aus. *Lillie*[1]) findet, daß $^{n}/_{24}$-, $^{n}/_{48}$- und $^{n}/_{96}$-NaCl praktisch gesprochen dieselbe Wirkung auf den osmotischen Druck von sowohl Gelatine als Eialbumen ausüben.

Dasselbe scheint nach *Roafs* Untersuchung für das Hämoglobin zu gelten; er findet für eine 1 proz. Lösung von Hämoglobin in folgenden Lösungen folgenden osmotischen Druck:

	mm Hg
0,9% NaCl	5,46
0,6% NaCl	5,59
0,45% NaCl	5,50

S. P. L. Sörensen[2]) zeigt in seiner großen Untersuchung über den osmotischen Druck des Eialbumens, daß der Einfluß der Salze darauf in engem Zusammenhang steht mit *Donnans* Theorie von der Verteilung der diffusibeln Ionen bei Vorhandensein von indiffusibeln. Wie schwer es auch sein mag, die Bedeutung dieser Verhältnisse für das Blutkörperchenvolumen zu überblicken, so läßt sich doch u. a. daraus schließen, daß Elektrolyte und Anelektrolyte unmöglich denselben Einfluß auf den osmotischen Druck des kolloidalen Systems und auf das Volumen des Blutkörperchens ausüben können, und dennoch haben wir gesehen, daß z. B. isosmotische Lösungen von Rohrzucker und Na_2SO_4 dasselbe Blutkörperchenvolumen hervorrufen.

Zusammenfassung.

1. Ist die Auffassung der Blutkörperchen als eine Art *Pfeffer*sche Zelle richtig, muß das Blutkörperchenvolumen in Flüssigkeiten verschiedener osmotischer Konzentration durch das *van't Hoff-Boyle-Mariotte*sche Gesetz $p_0 V_0 = p_1 V_1$ (1) bestimmt sein.

[1]) Americ. journ. of physiol. **20**. 1907—1908.

[2]) Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet XII, 1915—1917 und Zeitschr. f. physiol. Chem. **106**. 1919.

2. Diese Gleichung gilt anscheinend nicht für die Blutkörperchen, wenn V das Blutkörperchenvolumen selbst ist.

3. Gleichung (1) ist durch folgende Gleichung zu ersetzen:

$$p_o (V_o \div x) = p_1 (V_1 \div x) \qquad (2),$$

wo x das Volumen der dispersen Phase bezeichnet.

5. Es wurde versucht, das Volumen der dispersen Phase (x) in verschiedener Weise zu bestimmen, und es ergab sich als etwa 10% größer als der Trockenstoffvolumenprozentsatz des Blutkörperchens.

5. Wird der gefundene Wert von x in Gleichung (2) eingeführt, so wird das aus dieser Gleichung berechnete Blutkörperchenvolumen recht genau mit dem tatsächlich gefundenen übereinstimmen, woraus man wieder schließen mag, daß das Volumen des Blutkörperchens durch die osmotische Konzentration der äußeren Flüssigkeit bestimmt wird.

6. Die kleinen Abweichungen, welche vorkommen, finden eine wahrscheinliche Erklärung in der Annahme von Änderungen des „Dissoziationsgrades“ sowie in der Annahme, daß

7. das Blutkörperchenhäutchen einen geringen Widerstand gegen das Schwellen zu leisten vermag.

Untersuchungen über die Permeabilität des Blutkörperchenhäutchens für Elektrolyte.

IV. Mitteilung.

Studien über das osmotische Verhalten der Blutkörperchen.

Von

Rich. Ege.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 4. März 1922.)

Es liegt nicht in meiner Absicht, eine Gesamtdarstellung der Lehre vom Verhalten des Blutkörperchenhäutchens gegenüber den Elektrolyten zu liefern; dazu ist dies Thema teils viel zu groß, teils schon zu oft behandelt worden. Ich werde mich auf eine Besprechung einzelner Abschnitte dieses interessanten Problems beschränken, die mit meinen früher veröffentlichten Versuchen über das Blutkörperchenvolumen[1]) sowie einigen anderen Versuchen in direkter Verbindung stehen, die in einzelnen Beziehungen über die Elektrolytenpermeabilität der Blutkörperchen neues Licht verbreiten. Es handelt sich hier um das Vermögen der Anionen, das Blutkörperchenhäutchen zu durchdringen.

Trotz mehrerer neuer Untersuchungen von *Hamburger* behaupte ich, daß die Blutkörperchen entweder für das Kat- oder für das Anion der gewöhnlichen Salze impermeabel sein müssen, und daß sie sich daher, was Volumenveränderungen betrifft, im großen ganzen betragen, als wären sie impermeabel für das Salz als solches.

Wie wir gesehen haben, nimmt das Blutkörperchen in einer Anelektrolytenlösung, z. B. Rohrzucker, sofort ein gegebenes Volumen an, das durch den osmotischen Druck der Rohrzuckerlösung bestimmt ist und mit demselben oder nach dem *van't Hoff-Boyle-Mariotte*schen Gesetz schwankt[2]).

Dieses Volumen behält das Blutkörperchen 6—12 Stunden lang (wonach ein geringes Schrumpfen eintritt). Diese beiden Umstände befürworten in ganz außerordentlichem Maße die Auffassung, daß das

---

[1]) *Richard Ege*, diese Zeitschr. **115**, 109, 175. 1921.

[2]) *Richard Ege*, diese Zeitschr. **115**, 109.

Blutkörperchen als eine *Pfeffer*sche Zelle aufgefaßt werden kann, die von einer Membran umgeben ist, die sowohl für die Stoffe der äußeren Flüssigkeit als für die der Blutkörperchenflüssigkeit impermeabel ist. Nur einen einzigen Umstand muß man dennoch in Betracht ziehen: Wenn das Blutkörperchenhäutchen einen unendlich geringen Elastizitätskoeffizienten hat, so daß die Volumenveränderungen, die das Blutkörperchen gezwungen wird durchzumachen, nicht durch die Elastizität des Häutchens bekämpft werden, so kann das obengenannte Verhältnis auch durch die Annahme einer Permeabilität sowohl für die Stoffe der äußeren als für die der inneren Flüssigkeit erklärt werden, wohl zu bemerken, wenn die Permeabilitätsgeschwindigkeit dieser Stoffe die gleiche und ganz außerordentlich gering wäre im Vergleich mit der des Wassers; wenn das Häutchen, ohne elastisch zu sein, gegen ein Strecken und Schrumpfen Widerstand leistet, kann zwischen den Permeabilitätsgeschwindigkeiten der einzelnen Stoffe ein Unterschied bestehen, ohne daß dies sich an dem Blutkörperchenvolumen zu zeigen braucht. Wenn nämlich die Stoffe der äußeren Flüssigkeit schneller hineindiffundieren, als die der inneren Flüssigkeit hinausdiffundieren, wird im Innern des Blutkörperchens ein hydrostatischer Überdruck entstehen, der die Stoffe der inneren Flüssigkeit in ihrem Hinausdringen begünstigen und das Hineindringen der der äußeren Flüssigkeit hemmen wird.

Nun ist die Permeabilitätsgeschwindigkeit, wie u. a. aus den folgenden Versuchen ersichtlich sein wird, für die Stoffe, an denen man sie bisher hat messen können, weit verschieden, was die erste Annahme unwahrscheinlich macht, und die Untersuchungen, welche über das Verhalten des Blutkörperchenhäutchens gegenüber Volumenveränderungen[1]) angestellt worden sind, scheinen auch die letztere Möglichkeit nicht zu befürworten.

Bei den Betrachtungen, die ich geltend machen werde, werde ich unter Impermeabilität des Häutchens für einen bestimmten Stoff nur eine ganz außerordentlich langsame Diffusionsgeschwindigkeit dieses Stoffes im Vergleich mit der des Wassers verstehen; eine sehr langsame Permeabilität kann ich nicht absolut in Abrede stellen.

Von anderen Umständen, welche für eine Impermeabilität der meisten anorganischen Salze reden — inwiefern die Impermeabilität für beide Ionen oder nur für eins davon gilt, wird später erörtert werden — soll angeführt werden:

Die weit verschiedenen Konzentrationen, in denen die Kationen in Plasma und Blutkörperchen vorkommen; daß diese Konzentrations-

[1]) *Rich. Ege*, Der osmotische Druck in Blutkörperchen und Plasma, diese Zeitschr. **115**. 1921; *Rich. Ege*, Untersuchungen über die Volumenveränderung der Blutkörper in Lösungen von verschiedenem osmotischen Druck, diese Zeitschr. **130**. 1922.

differenz nicht nur eine Konzentrationsdifferenz, sondern eine tatsächliche Tensionsdifferenz ist, die sich daher nicht aus spezifischen Adsorptionsverhältnissen erklären läßt, wogegen dies Verhältnis eine einfache und leichte Erklärung findet durch die Annahme einer das Blutkörperchen umgebenden semipermeablen Membran — dies wird durch eine Reihe von verschiedenen Verhältnissen befürwortet. So wirkt hämolysiertes Blut giftig auf das Herz im Gegensatz zu gewöhnlichem Blut, welche Giftwirkung eine Kaliumvergiftung zu sein scheint; ist dies tatsächlich der Fall, so hat man darin einen Beweis dafür, daß die Kaliumionentension größer ist in den Blutkörperchen als im Plasma.

Hinzuweisen ist noch auf *O. Warburgs* Versuche[1]) über die Wirkung verschiedener Stoffe auf den Sauerstoffverbrauch der Vogelblutkörperchen. Gewisse Stoffe, von denen man aus anderen Untersuchungen wußte, daß sie das Blutkörperchenhäutchen durchdringen, vermochten den Sauerstoffverbrauch der intakten Blutkörperchen zu hemmen; dagegen hatten Mg-, Ca- und Ba-Salze keinen Einfluß auf die intakten Blutkörperchen. Wird das Blutkörperchenhäutchen durch vorsichtiges Gefrieren und Auftauen gesprengt — welche Behandlung die Atmung nicht beeinflußt —, so wird derselbe Zusatz der genannten Salze eine kräftige hemmende Wirkung auf den Sauerstoffverbrauch ausüben.

Diese Umstände — und mehrere andere — scheinen entschieden für die Impermeabilität der Blutkörperchen entweder für Kat- oder für Anionen zu sprechen; ich wünsche nur anzuführen, daß der ganz außerordentlich große Widerstand der Blutkörperchen gegen den elektrischen Strom, der oft als ein besonders guter Beweis für die Impermeabilität des Häutchens für Elektrolyte angeführt wird, in dieser Beziehung durchaus nichts beweist. Eine solche Folgerung ist, wie aus dem folgenden hervorgehen wird, verfehlt; das Blutkörperchenhäutchen ist nämlich permeabel für Anionen und einzelne Kationen (NH_4^+), aber auch wenn die Blutkörperchen in einer z. B. NH_4Cl enthaltenden Lösung aufgeschlemmt sind, finden wir praktisch gesprochen denselben außerordentlich großen Widerstand in der Blutkörperchenmasse wie unter normalen Verhältnissen. Das einzige, was wir schließen dürfen, ist, daß das Häutchen, wenn es auch für Elektrolyte permeabel ist, den Ionen einen viel größeren Widerstand bereitet als das Plasma und die freie Blutkörperchenflüssigkeit[2]).

Wenn das Blutkörperchenhäutchen sich bei Aufschlemmung der Blutkörperchen in einer Rohrzuckerlösung als impermeabel für Salze

[1]) Über Beeinflussung der Sauerstoffatmung. Zeitschr. f. physiol. Chemie **70**. 1911.

[2]) Ich stütze mich hier auf eine Reihe von Untersuchungen über das Leitungsvermögen der Blutkörperchen bei verschiedener Behandlung, Gefrierhämolyse, Saponinhämolyse, Formolbehandlung usw., die ich später veröffentlichen werde.

ergibt, braucht es, wie von *Ostwald* (1890) hervorgehoben, nur für das eine Ion permeabel zu sein[1]). Bereits 1896 tat *Gryns* dar[2]), daß eine Reihe von Ammoniumsalzen in einer dem Plasma isosmotischen Konzentration eine Hämolyse hervorrufen, wogegen die Blutkörperchen nicht hämolysieren, wenn dieselbe Menge NH_4-Salz in einer 0,9 proz. NaCl-Lösung gelöst wird, in der die Blutkörperchen aufgeschlemmt vorhanden sind, und er schloß daraus — nachdem er erst für ein einzelnes dieser Salze (NH_4Cl) gezeigt hatte, daß es nach der direkten chemischen Analyse in die Blutkörperchen eindringt —, daß diese NH_4-Salze in die Blutkörperchen hinein zu diffundieren vermögen. Einzelne NH_4-Salze rufen sowohl in Wasser als in physiologischer Salzlösung eine schnelle Hämolyse hervor. Diese Salze wirken also direkt schädlich auf die Blutkörperchen; was diese Salze betrifft, ist es daher ganz außerordentlich schwierig, nach dieser Methode zu entscheiden, inwiefern sie eindringen oder nicht. *Gryns* behauptet, daß, wenn die Hämolyse mit praktisch gesprochen derselben Geschwindigkeit vonstatten geht, wenn der Stoff in Wasser oder in physiologischer Salzlösung gelöst worden ist, so sei dies ein Beweis dafür, daß das Salz nicht in das Blutkörperchen eindringt. Mittels dieser Methode findet er, daß das Blutkörperchenhäutchen permeabel ist für eine Reihe von NH_4-Salzen, von denen von den anorganischen nur das Chlorid angeführt werden soll.

Dagegen ist das Blutkörperchenhäutchen impermeabel für Ammoniumnitrat, -sulfat und -phosphat, um nur die gewöhnlichsten anorganischen Salze zu nennen.

Daraus schließt *Gryns* in Übereinstimmung mit dem *Ostwald*schen Prinzip, daß das Blutkörperchenhäutchen, wenn ein Salz eine osmotische Hämolyse verursachen soll, für die Ionen beider Salze permeabel sein muß. Da nun NH_4Cl in das Blutkörperchen eindringt, muß das Häutchen sowohl für NH_4^+ als Cl^- permeabel sein. Wenn Natrium-, Kalium-, Calcium- usw. Chlorid keine osmotische Hämolyse verursacht, haben wir damit einen Beweis dafür, daß diese Kationen nicht durch das Blutkörperchenhäutchen zu dringen vermögen; um zu prüfen, welche Anionen durch das Blutkörperchenhäutchen dringen können, nützt es nicht, das Natriumsalz der Säure anzuwenden, denn in dem Falle wird das Natriumion die Wanderung des Anions verhindern, wenn letzteres auch an und für sich diffusibel ist. Wenn das Blutkörperchenhäutchen nach *Gryns* impermeabel für NH_4NO_3 und $(NH_4)_2SO_4$ und $(NH_4)_2HPO_4$ ist, so kann dies nur von einer Impermeabilität dem betreffenden Säureion gegenüber herrühren.

---

[1]) Elektrische Eigenschaften halbdurchlässiger Scheidewände. Zeitschr. f. physikal. Chem. 6. 1890.

[2]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 1896.

Gryns denkt hier nicht an die Möglichkeit eines Austausches zwischen den Anionen der äußeren Flüssigkeit und des Blutkörpercheninhaltes, eine Ausgleichung, die sich im übrigen durch diese Hämolyseversuche nicht wird feststellen lassen. *Gryns* Resultate wurden durch Untersuchungen von *Hedin* bestätigt[1]). *Hedin* analysiert allerdings nicht auf die Stoffe direkt, untersucht aber die Gefrierpunktsdepressionsveränderung nach Zusatz einer bestimmten Stoffmenge zu einer bekannten Blutmenge; findet er hier dieselbe Vermehrung der Gefrierpunktserniedrigung wie beim Zusatz derselben Stoffmenge zu derselben Menge Plasma, so hat man darin einen Beweis dafür, daß der Stoff sich gleichmäßig zwischen Plasma und Blutkörperchen verteilt hat; findet er dagegen eine größere Steigerung der Gefrierpunktserniedrigung in dem aus dem Blut gewonnenen Plasma als in dem reinen Plasma, so muß das meiste vom Stoff in dem Plasma geblieben sein; beträgt das Plasma 60%, und ist die Depressionsveränderung $^{100}/_{60}$ mal so groß wie bei Lösung des Stoffes in demselben Volumen Plasma, in dem man Blut verwendet hat, so ist von dem Stoffe nichts in die Blutkörperchen hineingedrungen. Von seinen Versuchen aus schließt *Hedin*, daß NH_4Cl und NH_4Br sich gleichmäßig zwischen Plasma und Blutkörperchen verteilen, wogegen $(NH_4)_2SO_4$ nur in geringem Maße in das Blutkörperchen eindringt, was sich nach *Hedin* vielleicht durch die Annahme erklären läßt, daß NH_4Cl und NH_4Br schnell, $(NH_4)_2SO_4$ dagegen sehr langsam in die Blutkörperchen eindringt. Etwas Bestimmtes läßt sich darüber nicht sagen, da uns der Zeitfaktor fehlt.

Gegen diese Resultate erhebt *Overton* Einspruch, indem er dartun zu können meint, daß die intakte Muskelzelle für NH_4-Salze impermeabel ist[2]); dasselbe Verhältnis gilt seiner Meinung nach auch für die roten Blutkörperchen; wenn sie in Lösungen von Ammoniumsalzen hämolysieren, stehen wir hier einer Zerstörung des Blutkörperchenhäutchens infolge der Giftwirkung der Ammoniumsalze gegenüber.

Ein solcher Standpunkt läßt sich doch schwerlich aufrechterhalten; allerdings wirken die Ammoniumsalze in starken Konzentrationen direkt schädlich auf die Blutkörperchen, indem sie eine Hämolyse bewirken können, wenn sie auch in physiologischer Salzlösung gelöst werden; in schwächerer Konzentration gilt dies jedoch von einer großen Menge von NH_4-Salzen nicht. Sicherlich kann man außerdem mit Recht behaupten, daß NH_4^+ auch in den Mengen, in denen es im normalen

---

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. **68**. 1897.

[2]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **105**. 1904. Siehe auch: Über die osmotischen Eigenschaften der Zelle in ihrer Bedeutung für die Toxikologie usw. Vierteljahrsschr. d. naturf. Gesellsch. Zürich 1896.

Blute vorkommt, sich sowohl im Plasma als in dem Blutkörperchen[1]) findet, und daß NH_4^+ sich auch bei Zusatz von ganz kleinen Mengen zwischen Plasma und Blutkörperchen verteilt[2]).

Man muß mit der Schlußfolgerung aus den Permeabilitätsverhältnissen der Blutkörperchen bei Vorhandensein von größeren Mengen Ammoniaksalz auf die Permeabilitätsverhältnisse unter physiologischen Bedingungen jedoch etwas vorsichtig sein.

Ein wesentlicher Mangel bei *Gryns'* Versuchen ist es, daß er nur Hämolyseversuche angestellt hat. Es ist ihm daher unmöglich, zu entscheiden, ob ein NH_4-Salz gar nicht oder nur sehr langsam eindringt.

Nach dem im vorhergehenden Besprochenen ist man meiner Ansicht nach berechtigt, zu behaupten, daß wir an den Ammoniumverbindungen der verschiedenen Säuren ein einfaches Mittel besitzen, um zu entscheiden, inwiefern die verschiedenen Anionen in das Blutkörperchenhäutchen eindringen oder nicht.

Schwemmt man die Blutkörperchen in Lösungen der verschiedenen NH_4-Salze bekannter Konzentrationen auf, und bestimmt man dann und wann das Volumen der Blutkörperchen, so hat man hier ein Mittel, nicht nur zu entscheiden, inwiefern das Anion durch das Blutkörperchenhäutchen dringt, sondern man besitzt auch an der Schwellungsgeschwindigkeit einen Maßstab für die Permeabilitätsgeschwindigkeit der verschiedenen Anionen. Statt mit reinen Ammoniumsalzlösungen zu arbeiten, kann man auch eine indiffusible Anelektrolytenlösung (z. B. Rohrzucker) mit Zusatz einer bekannten Menge von NH_4-Salz benutzen, was in verschiedenen Fällen von Vorteil sein kann; dagegen kann man nicht das NH_4-Salz in einer Elektrolytenlösung (z. B. 0,9% NaCl) lösen, da die Schwellungsgeschwindigkeit in dem Falle nicht nur von der Geschwindigkeit, mit der das ursprünglich an NH_4^+ geknüpfte Anion durch das Blutkörperchenhäutchen dringt, sondern natürlicherweise auch von der Geschwindigkeit abhängig ist, mit der $Cl^{\div}$ durch das Blutkörperchenhäutchen dringt.

Die Volumenbestimmungen wurden mittels *Hamburgers* Conohämatokrit ausgeführt[3]); da es sich um Serienbestimmungen handelt, habe ich 1 ccm Blut (oder Blutkörperchenbrei) zu 40 ccm Salzlösung abgemessen, gemischt und sodann die Blutkörperchen durch fortwährendes gelindes Schütteln mittels eines Schüttelapparates in Aufschwemmung erhalten. Ab und zu wurden 2 ccm entnommen, die in den Hämatokritröhren zentrifugiert wurden.

---

[1]) Siehe *V. Henriques* und *E. Christiansen*, diese Zeitschr. **80**. 1917.

[2]) *Paul Iversen*, Ammoniums Forhold i Organismen. Inaug.-Diss. København 1918.

[3]) Siehe *Rich. Ege*, diese Zeitschr. **109**. 1920.

Benutzt man eine NH_4Cl-Lösung, die dem Plasma isosmotisch ist, werden die Blutkörperchen total hämolysieren, bevor man die Blutkörperchen abzentrifugieren kann; da spätere Versuche zeigten, daß NH_4Cl in dieser Konzentration kein ausgeprägtes direkt hämolysierendes Vermögen besitzt, muß die Hämolyse auf dem Umstand beruhen, daß NH_4Cl so schnell in die Blutkörperchen eindringt, daß das Schwellen im Laufe der Zeit, welche verstreicht, bevor die Scheidung durchgeführt ist, so kräftig ist, daß die Blutkörperchen „bersten" müssen.

Das Verhältnis ist der Hämolyse der Blutkörperchen in Harnstofflösungen analog, jedoch dringt NH_4Cl, wie man aus späteren Versuchen ersehen wird, wesentlich langsamer ein als Harnstoff.

Arbeitet man nämlich mit einer NH_4Cl-Lösung, die eine 2—3 mal so große molare Konzentration hat wie das Plasma, und arbeitet man schnell, wird man, namentlich wenn man über eine schnellaufende Zentrifuge verfügt, die Blutkörperchen niederschlagen können, bevor sie Zeit haben, total zu hämolysieren, was dagegen in einer Harnstofflösung entsprechender Konzentration nicht gelingen wird.

NH_4Cl dringt so schnell in die Blutkörperchen ein, daß es in reinen NH_4Cl-Lösungen nicht möglich ist, die Permeabilitätsgeschwindigkeit in Ziffern anzugeben. Dies ist aber möglich, wenn NH_4Cl in Rohrzucker gelöst wird, wie wir dies später zeigen werden. Das Eindringen geht hier nämlich nicht momentan vonstatten. Es ist von diesen Messungen aus natürlicherweise durchaus unmöglich, zu entscheiden, ob $NH_4^{\cdot}$ oder $Cl^{\cdot}$ die Ursache der — im Vergleich mit Wasser — verhältnismäßig langsamen Permeabilität ist.

Zeigt es sich aber, daß andere NH_4-Salze langsamer in das Blutkörperchen eindringen, so muß das darauf beruhen, daß das betreffende Anion langsamer eindringt als $Cl^{\cdot}$, wenn es sich naturgemäß auch nicht entscheiden läßt, um wievielmal langsamer.

Im folgenden führen wir die Resultate von Versuchen über die Schwellungsgeschwindigkeit der Blutkörperchen in verschiedenen Ammoniumsalzlösungen an. Das Zahlenmaterial und die näheren Details finden sich in „Studier over Glykosens Fordeling mellem Plasma og de roede Blodlegemer"[1]).

Die Versuche sind in verschiedene Serien geordnet; die Schwellungsgeschwindigkeit innerhalb derselben Serie bietet vergleichbare Werte der Geschwindigkeit dar, mit der das Salz in die Blutkörperchen eindringt, indem die Versuche innerhalb der einzelnen Serie mit derselben Blutprobe, bei derselben Temperatur ausgeführt wurden, und indem, was entscheidend ist, die Tensionsdifferenz der verschiedenen Anionen praktisch gesprochen identisch ist, wenn der Vergleich bei demselben Blutkörperchenvolumen (abgesehen von $Cl^{\cdot}$) ausgeführt wird; dagegen

[1]) Inaug.-Diss. Kopenhagen 1919—20.

lassen die verschiedenen Serien sich nicht unter sich vergleichen, jedenfalls nicht ohne umfassende Berechnungen. Wir führen ein Beispiel von solchen Versuchen an. Die erste Kolumne enthält die Zeitdifferenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Bestimmungen, die zweite das relative Blutkörperchenvolumen, die dritte die Schwellungsgeschwindigkeit pro Stunde.

Serie I.

$(NH_4)_2SO_4$ 1,8% Kaninchenblut.

8 Min. nach der Misch.	98		
59 Min.		3,5	
	101,4		
85 Min.		2,3	
	104,6		
117 Min.		4,6	
	113,6		
17 Stunden		1,6	
	139,3		ganz geringe Hämolyse

In derselben Weise fanden Bestimmungen der Schwellungsgeschwindigkeit der Blutkörperchen statt in $(NH_4)_2CrO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$, NH_4NO_3, Ammoniumoxalat, -citrat und -tartrat.

Die Eindringungsgeschwindigkeit (das Penetrationsvermögen) ist bei diesen Stoffen verhältnismäßig gering. Die Untersuchung hat sich daher bei diesen Salzen bewerkstelligen lassen, trotzdem die Tension des Ammoniumsalzes in der äußeren Flüssigkeit sehr groß ist und der Versuch nur angestellt werden kann, bis die Hämolyse eintritt, was zu einem Zeitpunkt der Fall sein wird, wo die Druckdifferenz zwischen dem Ammoniumsalz in der äußeren Flüssigkeit und im Blutkörpercheninhalt noch eine recht große sein wird (etwa 3—4 Atm.).

Ammoniumsalze, deren Anionen mit großer Geschwindigkeit durch das Blutkörperchenhäutchen dringen, werden auch bei großer Anfangskonzentration ($^1/_2$ m) eine Schwellungshämolyse so schnell hervorgerufen haben, daß die Permeabilitätsgeschwindigkeit sich nicht bestimmen läßt. In dem Falle muß das Salz in einer Rohrzuckerlösung gelöst werden; hier wird die Schwellungsgeschwindigkeit zuletzt meßbar werden, da der Differentialdruck, der die Diffusion des Salzes bewirkt, gegen Null hinabsinkt, ohne daß die Blutkörperchen hämolysieren.

Als Beispiel eines Versuches der genannten Art führen wir folgendes an:

Serie III.

NH_4Cl; 15 ccm $^1/_3$ m NH_4Cl + 15 ccm 11% Rohrzucker + 1 ccm Kaninchenblut.

3 Min. nach der Misch.		
	71	
27 Min		44
	91	
21 Min.		16
	96,7	

17 Min. nach der Misch.		15
	101	
90 Min.		
	96[1])	
3 Stunden 40 Min.		
	98	
14 Stunden		
	96	
34 Stunden		
	89,4	

Volumen in 15 ccm 11% Rohrzucker + 15 ccm H_2O = 100.

Bei diesem Verfahren ist die Schwellungsgeschwindigkeit der Blutkörperchen bestimmt worden bei Vorhandensein von $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Br, $(NH_4)_2CO_3$, Ammoniumformiat und Ammoniumacetat.

Von Salzen, die ich untersucht habe, die aber meiner Meinung nach nicht zur Bestimmung der Permeabilitätsgeschwindigkeit nach der von mir befolgten Methode benutzt werden können, mögen folgende genannt werden:

1. Ammoniumfluorid, 2. Ammoniumcyanat, 3. Ammoniumsulfocyanat, 4. Ammoniumsulfid, 5. Ammoniumpersulfat, 6. Ammoniumdichromat, 7. Ammoniummolybdat.

Die Salze 4—7 zerstören die Blutkörperchen und das Hämoglobin vollständig und einigermaßen schnell, seien sie nun in reinen Lösungen oder in geringer Konzentration in einer dem Blute isosmotischen Rohrzuckerlösung vorhanden. Die Permeabilitätsgeschwindigkeit dieser Salze läßt sich daher gar nicht mittels des Hämatokrits bestimmen. Beim Fluorid, Cyanat und Sulfocyanat läßt das Permeabilitätsvermögen und die Geschwindigkeit sich eben ahnen. Ammoniumfluorid scheint also in die Blutkörperchen hineinzudringen, aber verhältnismäßig langsam.

Sowohl Ammoniumcyanat als Sulfocyanat dringen in die Blutkörperchen ein, letzteres (Ionenzahl 58) mit bedeutend geringerer Geschwindigkeit als ersteres (Ionenzahl 42), wegen der kräftigen destruierenden Wirkung kann man diesen Versuchen aber natürlicherweise keine große Bedeutung beimessen.

Diese Schwellungsuntersuchungen liefern nur einen indirekten Beweis und Maßstab für das Eindringen der Ammoniumsalze in die Blutkörperchen; bevor ich daher aus meinen Untersuchungen die Penetrationsgeschwindigkeit dieser Stoffe berechne, werde ich wieder darstellen, welche Argumente uns dazu berechtigen, das Schwellen als einen Beweis des Eindringens der Stoffe der äußeren Flüssigkeit zu betrachten.

[1]) Die Ursache dieses langsamen Nachschrumpfens ist unbekannt; wir stehen hier einer allgemeinen Erscheinung gegenüber, die vom Verf. beschrieben und näher untersucht worden ist. Diese Zeitschr. **115**, 1921.

1. Vorerst ist anzuführen, daß diese Auffassung eine notwendige Folge der osmotischen Membrantheorie ist.

2. Die Schwellungsverhältnisse sowohl in reinen Ammoniumsalzlösungen als in Rohrzuckerlösungen, zu denen diese Salze gesetzt worden sind, lassen sich schwerlich mit anderen Theorien in Übereinstimmung bringen.

3. Die direkten und indirekten chemischen Analysen, bzw. von *Gryns* und *Hedin*, zeigen tatsächlich, daß Ammoniumsalze in die Blutkörperchen eindringen. Zu diesen direkten Versuchen kann ich noch einen einzelnen hinzufügen. Rinderblutkörperchen, mit 8 proz. Rohrzucker gewaschen, wurden mit gleichen Teilen von 8 proz. Rohrzucker, 2,2 proz. $(NH_4)_2SO_4$ gemischt.

5 Minuten nach der Vermischung betrug das Blutkörperchenvolumen 29,
2 Stunden nach der Vermischung betrug das Blutkörperchenvolumen 31,
20 Stunden nach der Vermischung betrug das Blutkörperchenvolumen 34[1]).

Als Vergleich dient, daß der mit 8 proz. Rohrzucker vermischte Blutkörperchenbrei ein Blutkörperchenvolumen von 37 hat.

Wir stehen also hier einem sehr langsamen Schwellen gegenüber, wie dies immer bei $(NH_4)_2SO_4$ enthaltenden Lösungen der Fall ist; dies langsame Schwellen muß ein langsames Eindringen von $(NH_4)_2SO_4$ bedeuten, ein Eindringen, von dem wir annehmen müssen, daß es noch nach 20 Stunden keine vollständige Ausgleichung bewirkt hat, da die Blutkörperchen noch nicht zu dem Volumen angeschwollen sind, das die Blutkörperchen in der 8 proz. Rohrzuckerlösung einnehmen. Wir wollen nun sehen, wie diese Annahme von dem langsamen Eindringen des Ammoniumsulfates den direkten, nach *Henriques* und *Christiansens* Verfahren ausgeführten Ammoniumanalysen entspricht.

20 Minuten nach der Vermischung war das Verteilungsverhältnis von NH_4OH in den Blutkörperchen und der äußeren Flüssigkeit:

23%
$2^1/_4$ Stunden später
40%
20 Stunden später
65%

Es kann also nach den direkten Analysen nicht bezweifelt werden, daß $(NH_4)_2SO_4$ nur ganz langsam in die Blutkörperchen einzudringen vermag, und daß die direkten Analysen — soweit wir vorläufig in groben Zügen schließen dürfen — mit den Schwellungsresultaten übereinstimmen.

Die angeführten Untersuchungen bieten uns die Mittel dar, uns von der relativen Penetrationsgeschwindigkeit der verschiedenen Anionen

[1]) Korrigiert für die schwache Hämolyse.

gegenüber dem Blutkörperchenhäutchen mindestens eine Vorstellung bilden zu können. Eine Berechnung der absoluten Permeabilitätsgeschwindigkeit ist nicht möglich, u. a. weil die Dicke des Blutkörperchenhäutchens unbekannt ist; natürlicherweise ließe sich die Permeabilitätsgeschwindigkeit berechnen, wenn man ganz von der begrenzenden Haut absehen und das Blutkörperchen als eine homogene Masse betrachten wollte; aber eine solche Betrachtungsweise ist nicht berechtigt, da es tatsächlich die äußere Begrenzung des Blutkörperchens ist, die gegen die Ionenwanderung Widerstand leistet, wie dies u. a. aus noch nicht veröffentlichten Untersuchungen über das elektrische Leitungsvermögen der Blutkörperchen hervorgeht. Es sind daher nicht versucht worden, von der absoluten Permeabilitätsgeschwindigkeit eine detaillierte Berechnung zu gewinnen. Die Berechnung der relativen Permeabilitätsgeschwindigkeit kann verschiedenermaßen stattfinden. Der Ausgangspunkt sämtlicher Betrachtungen ist, daß die Schwellungsgeschwindigkeit, welche dieselbe Blutkörperchenprobe unter denselben Verhältnissen und bei demselben Ammoniumsalzdruck[1]) aufweist, einen Maßstab der Penetrationsgeschwindigkeit des betreffenden Anions gegenüber dem Blutkörperchenhäutchen abgeben muß. In betreff der detaillierten Berechnung und einer Reihe daran anknüpfender Betrachtungen muß auf die oben angeführte dänische Arbeit verwiesen werden.

Die Schwellungsgeschwindigkeit gibt jedoch, da die Versuche sowohl mit mono- als divalenten Anionen ausgeführt wurden, keinen direkten Maßstab für die relative Permeabilitätsgeschwindigkeit der Anionen ab; um diese zu berechnen, ist es notwendig, die Zahlen der divalenten Anionen durch $^3/_2$ zu dividieren oder die Zahlen der monovalenten mit $^3/_2$ zu multiplizieren; man erhält dann folgende Reihe:

	Diffusionsgeschwindigkeit	Ionenzahl
SO_4^{--}	1,0	96
HPO_4^{--}	2,0	96
$(COO)_2^{--}$	2,5	88
CrO_4^{--}	10,8	118
NO_3^{-}	10,5	62
Br^{-}	13,5	80
Co_3^{--}	etwa 20	60
Cl^{-}	etwa 30	35,5

Hinzugefügt muß werden, daß sowohl $HCOO^{-}$ (Ionenzahl 45) als CH_3COO^{-} (Ionenzahl 59) schneller in die Blutkörperchen eindringen als Cl^{-}, während Tartrat (Ionenzahl 148) und das Citration (Ionenzahl

[1]) Bei der Berechnung wurde auf die verschiedenen Dissoziationskonstanten der Ammoniaksalze keine Rücksicht genommen, da man noch nicht weiß, ob nicht auch der undissoziierte Stoff durch das Blutkörperchenhäutchen zu dringen vermag.

178) überhaupt nicht durch das Blutkörperchenhäutchen zu dringen vermögen.

Wie erwähnt, glaube ich nicht, daß die absoluten Diffusionsgeschwindigkeiten von größerer Bedeutung sind, wogegen es wohl von einigem Interesse sein könnte, die Größenordnung der Diffusionskonstante der Anionen zu bestimmen und mit den von *Krogh* bestimmten Diffusionskonstanten von Gasen gegenüber Muskel, Bindegewebe usw. zu vergleichen. *Krogh* definiert die Diffusionskonstante als die Anzahl Kubikzentimeter, die bei 1 Atm. Differenzdruck in der Minute durch 1 qcm Membrane von einer Dicke von 1 μ diffundieren, und findet für dieselbe folgende Größen:

0,14 bei Muskelgewebe,
0,12 bei Bindegewebe,
0,01 bei Chitin.

Bei meinen Berechnungen der Diffusionskonstante benutze ich *Kroghs* Definition, indem ich sie jedoch in Anzahl Milligramm statt Anzahl Kubikzentimeter ausdrücke. Setzen wir die Dicke des Blutkörperchenhäutchens zu 0,1 μ an, wird die Diffusionskonstante des Cl^- durch die Blutkörperchenmembran zu ca. $0{,}3 \cdot 10^{-6}$ und für SO_4^{--} ca. $0{,}1 \cdot 10^{-7}$.

Kroghs Diffusionskonstante wird in Milligramm ausgedrückt für Sauerstoff bei Muskelgewebe 0,2 betragen. Die Diffusionskonstanten für Anionen durch die Blutkörperchenmembran sind also fast unendlich klein.

Wenn das Material, worüber ich verfüge, auch nur unvollständig ist, welchen Mangel ich bei neuen Versuchen zu beseitigen hoffe, bei denen ich gern quantitative Bestimmungen über die Geschwindigkeit ausführen möchte, mit der die organischen Stoffe, die nach *Gryns* Untersuchungen in großer Anzahl in das Blutkörperchen einzudringen vermögen, durch das Blutkörperchenhäutchen diffundieren; hier wo man mit homologen Reihen zu tun haben kann, z. B. den fetten Säuren (Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure usw.) müßte man wahrscheinlich zu interessanten Resultaten über die Faktoren gelangen können, die für die Permeabilitätsgeschwindigkeit der Anionen maßgebend sind — so will ich jedoch bereits jetzt an diese Bestimmungen einige theoretische Bemerkungen knüpfen, da es meines Wissens das erstemal ist, wo quantitative Bestimmungen der Geschwindigkeit unternommen worden sind, mit der die Ionen durch das Blutkörperchenhäutchen zu dringen vermögen.

Zur Erklärung des Vermögens der Stoffe, durch Membranen zu dringen, verfügen wir über 2 Haupttheorien: I. Die Porentheorie, II. die Löslichkeitstheorie.

Nach der ersteren sind die Membranen von Poren verschiedener (ultramikroskopischer) Porenweite bei den verschiedenen Membranen

durchbohrt. Durch diese Poren müssen die Stoffe passieren, um die Membrane zu durchdringen. Die Permeabilitätsgeschwindigkeit wird bedingt durch die Größe (den Durchmesser) des Moleküls und die Weite der Pore. „Die Niederschlagsmembranen sind impermeabel nicht nur für ihre Membranbildner, sondern überhaupt für alle Körper, deren Molekül größer ist als die Interstitien der Membrane“[1]).

Um die Geschwindigkeit, mit der verschiedene Stoffe durch diese Membran dringen, nimmt man an, daß die Poren der Membran nicht alle dieselbe Weite besitzen; je größer die Moleküle sind, desto geringer wird die Anzahl der Poren sein, durch die sie passieren können, und um so viel langsamer werden sie durch die Membran dringen. Ist das Molekül noch größer, so gibt es keine (oder praktisch gesprochen keine) Poren, durch welche die Moleküle zu passieren vermögen; die Membran ist impermeabel oder praktisch gesprochen impermeabel für den betreffenden Stoff.

Nach den Löslichkeitstheorien, von denen die *Overton*sche Lipoidtheorie die am allgemeinsten angenommene ist, behauptet man, daß die wesentlichste Bedingung für das Vermögen eines Stoffes, durch eine Membran zu dringen, das Löslichkeitsverhältnis des betreffenden Stoffes in dem membranbildenden Stoffe ist.

Ist der Stoff in der Membran unlöslich, kann er nicht durch dieselbe dringen, und ist er darin löslich, wird er sie mit einer Geschwindigkeit durchdringen, die zuvörderst von dem Grade der Löslichkeit in der Membran und wohl auch von der Diffusionsgeschwindigkeit des Stoffes in der Membranphase abhängig ist. Diese Theorie bietet oft eine anscheinend leichtere Erklärung bekannter Permeabilitätsverhältnisse dar; dringt ein Stoff besonders schnell durch eine Membran und langsam durch eine andere, so erklären wir dies einfach aus einem Unterschied der Löslichkeit; die Theorie befriedigt aber natürlicherweise nicht, es sei denn, daß sie gleichzeitig eine wahrscheinliche Erklärung der verschiedenen Löslichkeitsverhältnisse abgibt; eine solche sucht *Overton* zu geben, indem er annimmt, daß das sowohl die Pflanzen- als die tierische Zelle umgebende Häutchen aus Lipoid besteht, weshalb nur lipoidlösliche Stoffe durch die Membran zu dringen vermögen; davon gibt es aber gar zu viele unerklärliche Ausnahmen, was vielleicht in noch höherem Grade der Fall sein wird, wenn man sich andere membranbildende Stoffe denkt.

Untersucht man die Porentheorie, so ist nicht zu leugnen, daß man eine Reihe von Momenten trifft, die sehr zu deren Gunsten eintreten[2]).

---

[1]) *M. Traube*, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1867.

[2]) Auf die Einzelheiten werde ich hier nicht eingehen, sondern nur auf das vorzügliche Kapitel in *Bayliss*, Principles of General Physiology verweisen.

Bei einer Reihe von Membranen findet man, daß sie permeabel für Krystalloide, impermeabel für Kolloide sind, während man auch Membranen hergestellt hat, die für gewisse Kolloide permeabel, für andere nicht permeabel sind, und hier scheint das Permeabilitätsvermögen sowie die Geschwindigkeit eine Funktion der Molekülgröße auszumachen.

Die Porentheorie scheint im Gegensatz zur Löslichkeitstheorie leicht zu widerlegen zu sein. Wenn man nur findet, daß ein Stoff von bekanntem Molekülvolumen nicht durch eine Membran zu dringen vermag, so muß diese Membran notwendigerweise für sämtliche Moleküle und Ionen, welche größer sind, impermeabel, und für sämtliche Moleküle und Ionen, welche kleiner sind, permeabel sein. Dieser Satz scheint nicht zuzutreffen, weder für die Pflanzen- noch für die tierische Zelle.

Das Blutkörperchenhäutchen (wie die tierische Zellenmembran im allgemeinen) ist ganz außerordentlich leicht permeabel für Harnstoff (Molekülzahl 60), während es impermeabel ist für NaCl (Molekülzahl 58,5); zudem wissen wir, daß NaCl als Na^{+} (23)[1] und $Cl^{\div}$ (35) vorkommt, was das Verhältnis anscheinend noch greller macht, oder um 2 Anelektrolyte zu vergleichen, so dringt Äthylurethan (89) leicht durch die Zellenmembran, während Aminoessigsäure (41) nicht in dieselbe eindringt, und so könnte man fortsetzen. *Höber* behauptet daher auch, daß „die Porentheorie bisher nur etwas für die Deutung der Permeabilitätsunterschiede gegenüber gewissen Kolloiden“ leiste[2]).

Mit welchen von den beiden Theorien lassen die obengenannten Permeabilitätsuntersuchungen sich nun am leichtesten in Übereinstimmung bringen?

Die ersten Versuche, die ich ausführte, wurden mit $Cl^{\div}$, $NO_3^{\div}$, $HPO_4^{\div\div}$, $SO_4^{\div\div}$, $(COO)_2^{\div\div}$ angestellt; diese Untersuchungen gaben das Resultat, daß die Permeabilitätsgeschwindigkeit für $Cl^{\div}$ (35,5) 30 mal und für $NO_3^{\div}$ (62) 10 mal so groß ist wie für $SO_4^{\div\div}$ (96), während $HPO_4^{\div\div}$ (96) und $(COO)_2^{\div\div}$ (88) eine Permeabilitätsgeschwindigkeit von ungefähr derselben Größenordnung wie $SO_4^{\div\div}$ hatte, während das Tartration (148) und das Citration (178) die Membran gar nicht zu durchdringen vermochten. An diesen Versuchen vermeinte ich eine Stütze für die Porentheorie gefunden zu haben.

Fortgesetzte Untersuchungen, welche ergaben, daß $Br^{\div}$ (80) eine größere Permeabilitätsgeschwindigkeit hatte als $NO_3^{\div}$ (62), und namentlich daß $CrO_4^{\div\div}$, Ionenzahl 118, etwa 10 mal so schnell in das Blutkörperchen eindringt wie $SO_4^{\div\div}$ mit einer Ionenzahl von nur 96, zeigten, was andere Erwägungen bereits längst hatten durchscheinen lassen, daß Permeabilitätsvermögen und Geschwindigkeit unmöglich einfach von der Molekül- oder Ionenzahl allein abhängig sein können; dies geht

[1]) Die Zahlen in den Parenthesen bezeichnen die Molekül- oder Ionenzahl.
[2]) Physikalische Chemie 4. Aufl. S. 398.

vielleicht am besten aus dem Umstand hervor, daß Li^+ (4) nicht durch das Blutkörperchenhäutchen zu dringen vermag, während sämtliche untersuchte Anionen, die dazu imstande sind, eine bedeutend höhere Ionenzahl besitzen.

Braucht man aber deshalb die Porentheorie aufzugeben? Das braucht man kaum, denn wir dürfen nicht vergessen, wozu man in der Tat geneigt ist, daß wir tatsächlich die relative Größe und Form der Moleküle nicht kennen, und daß diese keineswegs durch ihre Molekül- oder Ionenzahl allein bestimmt werden.

Wenn die Porentheorie zuzutreffen scheint, solange wir mit Kolloiden arbeiten, beruht das vielleicht darauf, daß die Vorstellungen, die wir uns von der relativen Größe dieser Moleküle bilden, sehr nahezu richtig sind, und der Grund davon, daß die Porentheorie gar nicht anwendbar zu sein scheint, wenn von den Permeabilitätsverhältnissen der Krystalloide die Rede ist, liegt vielleicht einfach darin, daß wir das Molekülmodell dieser Stoffe nicht kennen und daher noch nicht die Mittel besitzen, um entscheiden zu können, inwiefern dies oder jenes Molekül oder Ion mit größerer oder geringerer Leichtigkeit durch die Poren der Membran zu dringen vermögen wird. Wenn es also nicht nur das Blutkörperchenhäutchen ist — sowie andere tierische Membranen, durch die die NH_4-Salze zu dringen vermögen — sondern dasselbe auch bei einer Reihe von Präzipitationsmembranen der Fall ist, scheint es tatsächlich ein naheliegender Gedanke zu sein, daß NH_4^+ eine solche Form und Größe besitzt, daß es durch Molekularporen zu dringen vermag, durch welche andere positive Ionen nicht zu passieren vermögen. Wenn gleichfalls Präzipitationsmembranen leicht permeabel sind für NH_4Cl und impermeabel oder schwer permeabel für $(NH_4)_2SO_4$, ganz wie es mit den Blutkörperchen der Fall ist, so wird sich auch hier das Verhältnis am leichtesten durch die Annahme erklären lassen, daß $SO_4^{\div}$ einen größeren Durchmesser hat als $Cl^{\div}$. In dem letztangeführten Falle hat $Cl^{\div}$ eine kleinere Ionenzahl, aber wie gesagt braucht dies keineswegs der Fall zu sein, damit der Durchmesser oder das wahre Volumen des Ions, das Ionenmodell, oder welchen Ausdruck man nun wählen mag, als kleiner betrachtet werden muß. Denn man muß bedenken, daß die Masse des Atoms selbst nach den modernen Atomtheorien nur eine sehr geringe Ausdehnung hat, um die herum die Elektronen sich in näheren oder ferneren Ringen gruppieren.

Ein anderes Verhältnis, das sicherlich von größerem Interesse für die Permeabilitätstheorie ist, ist die Lehre vom Hydratation, nach welcher die Ionen von einer größeren oder geringeren Menge von Wassermolekülen umgeben sind. Die Anzahl der an das einzelne Ion geknüpften Wassermoleküle ist nicht mit Sicherheit bekannt. Zudem scheint die Zahl mit der Temperatur und möglicherweise auch mit anderen Um-

ständen, z. B. dem Lösungsmittel zu schwanken, durch welchen Umstand sich möglicherweise eine Aussicht zu einem Kompromiß zwischen der Porentheorie und der Löslichkeitstheorie eröffnet.

Zusammenfassung.

1. Die Schwellungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen in NH_4-Salzlösungen wurde gemessen.

2. Auf Grund dieser Messungen fanden Berechnungen der relativen Permeabilitätsgeschwindigkeit eine Reihe von Anionen statt.

3. Die Diffusionsgeschwindigkeit scheint in gewissem Maße von der Ionenzahl abhängig zu sein, so daß die Geschwindigkeit um so viel größer ist, je kleiner die Ionenzahl ist; es gibt jedoch viele Ausnahmen von dieser Regel.

Welchen Einfluß üben „diffusible" Anelektrolyte auf das Blutkörperchenvolumen aus.

V. Mitteilung.

Studien über das osmotische Verhalten der Blutkörperchen.

Von

Rich. Ege.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 4. März 1922.)

Als Glied einer Reihe von Untersuchungen über die osmotischen Verhältnisse der Blutkörperchen, die teils bereits publiziert worden sind[1]), teils später veröffentlicht werden sollen, und deren wesentlicher Zweck es ist, zu untersuchen, inwiefern die osmotische oder kolloidchemische Erklärung mit den tatsächlichen Verhältnissen übereinstimmt, ist es von Bedeutung, welchen Einfluß diejenigen Anelektrolyte, von denen man nach der direkten chemischen Analyse weiß, daß sie in das Blutkörperchen eindringen, auf das Volumen des Blutkörperchens ausüben. Falls die osmotische Erklärung die richtige ist, müssen die Blutkörperchen schwellen und zuletzt platzen, wenn sie in einer Flüssigkeit geschlemmt werden, die ausschließlich aus Stoffen besteht, für welche das Blutkörperchenhäutchen permeabel ist.

Welche augenblickliche Volumenveränderung das Blutkörperchen durchmachen wird, das ist teils von der Konzentration der Lösung, teils von der Permeabilitätsgeschwindigkeit des Stoffes durch das Blutkörperchenhäutchen abhängig; ist diese sehr groß (d. h. von derselben Größenordnung wie die des Wassers), müssen die Blutkörperchen platzen und spontan hämolysieren, welche Konzentration der Stoff auch haben mag.

Daß die Hämolyse durch ein Schwellen verursacht ist, das nur so schnell stattgefunden hat, daß es sich nicht nachweisen läßt, soll sich dadurch zu erkennen geben, daß die Blutkörperchen in einer 0,9 proz. NaCl-Lösung, die durch Zusatz des betreffenden Stoffes hyperosmotisch gemacht ist, sofort das Volumen annehmen — und bewahren — werden, das die Blutkörperchen in der 0,9 proz. NaCl-Lösung annehmen.

---

[1]) Diese Zeitschr. **115**, 109, 175 und **130**, 99, 116, 136.

Ist die Permeabilitätsgeschwindigkeit dagegen meßbar, werden die Blutkörperchen sofort ein Volumen annehmen, das um so kleiner ist, je konzentrierter die Lösung ist und je langsamer der Stoff diffundiert, aber die Blutkörperchen werden schwellen und schwellen, um schließlich zu hämolysieren. Das Volumen des Blutkörperchens verglichen mit den theoretischen, aus der osmotischen Konzentration der Flüssigkeit berechneten Volumen, gibt einen Maßstab ab für die jeweilig hineindiffundierte Menge, wie das Schwellen von einer Volumenbestimmung bis zur nächsten einen Ausdruck der Stoffmenge darstellt, die in der zwischenliegenden Zeit in das Blutkörperchen hineindiffundiert ist.

Wird der Stoff in einer isotonischen Lösung[1]) gelöst, so wird diese sofort als eine hypertonische Lösung auftreten; die Blutkörperchen werden schrumpfen, um später oder früher das ursprüngliche Volumen anzunehmen. Diese einfachen Verhältnisse gelten nur von Nichtelektrolyten; bei Elektrolyten ist die Sache etwas verwickelter, aber in der Hauptsache gelten doch dieselben Regeln.

Für den Harnstoff zeigte *Gryns*[2]), daß die Blutkörperchen in reinen Harnstofflösungen momentan hämolysierten, während die Hämolyse in 0,9 proz. NaCl nicht eintritt, wenn auch bis 10% Harnstoff zugesetzt wird. Der Harnstoff hat also keine spezifische hämolytische Wirkung. Die Hämolyse in reinen Harnstofflösungen muß also von einem reinen osmotischen Schwellen herrühren, ganz wie in Wasser, da der Harnstoff sich, was die Tension betrifft, sehr schnell gleichmäßig zwischen Blutkörperchen und Plasma verteilt.

Vom Äthylalkohol hat *Hedin*[3]) — wenn auch auf indirektem Wege — dargetan, daß er sich einigermaßen gleichmäßig zwischen Blutkörperchen und Plasma verteilt und, wie der Harnstoff, ohne Einfluß auf das Blutkörperchenvolumen ist. Vergleichen wir diese Untersuchungen mit denen von *Schöndorff*[2]) und namentlich mit den sehr sorgfältigen Untersuchungen von *Gad-Andersen*[4]), in denen mittels direkter chemischer Analysen dargetan wird, daß der Harnstoff sich einigermaßen gleichmäßig zwischen Plasma und Blutkörperchen verteilt, so scheint sich feststellen zu lassen, daß ein Stoff, der durch das Blutkörperchenhäutchen zu diffundieren vermag, keinen Einfluß auf das Blutkörperchenvolumen ausübt, wenn der Stoff in Substanz in einer isotonischen Salzlösung gelöst wird, was eben nach der osmotischen Theorie zu erwarten war.

Gegen diese Angaben hat es jedoch nicht an Widerspruch gefehlt. So hat *Knaffl-Lenz* in seinem Aufsatz „Über die kolloidchemischen

[1]) Eine Lösung, die das Blutkörperchenvolumen nicht ändern.
[2]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **63**. 1896.
[3]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **68**. 1897.
[4]) Diese Zeitschr. **107**. 1920. Compt. rend. **83**.

Vorgänge bei der Hämolyse"[1]) den Einfluß des Äthylalkohols und des Harnstoffs auf das Volumen der Blutkörperchen einer eingehenden Untersuchung unterworfen, wobei er zu dem Resultat kommt, daß diese Stoffe eine ganz spezifische Wirkung auf das Blutkörperchenvolumen ausüben, die sich nur kolloidchemisch erklären läßt. Er findet, daß der Alkohol während der ersten Stunde ein Schwellen von bis 15% bewirkt, das nach 4—5 Stunden in ein bedeutendes Schrumpfen übergeht. (Es wurde ein 3proz. Alkohol in 0,9proz. NaCl angewandt.)

Die beginnende Volumenvermehrung wird durch die Annahme erklärt, daß der Alkohol schneller in das Blutkörperchen eindringt als das Wasser hinausdringt! Das darauffolgende Schrumpfen rührt von einer spezifischen „Quellungshemmung" her, indem gleichfalls angenommen wird, daß der Alkohol das Schwellen hindert, das sonst in einer hypotonischen Flüssigkeit eintreten wird. Der Harnstoff dagegen ruft ein geringes, aber deutliches Schwellen von 2—5% hervor in Lösungen (0,9proz. NaCl), die $^{m}/_{30}$—$^{m}/_{50}$ in bezug auf Harnstoff sind.

Eine Nachprüfung dieser interessanten Angaben ergab, daß sie nicht zuverlässig sind. Zum Teil beruhen die *Knaffl-Lenz*schen Resultate sicherlich darauf, daß er die in einer NaCl-Lösung stattfindende Volumenveränderung nicht berücksichtigt hat[2]).

Versuch 1: 3 ccm abs. Alk. verdünnt bis zu 100 ccm mit $^{m}/_{8}$-NaCl 40 ccm + 1 ccm Blut

Min. nach der Vermischung	relatives Blutkörperchenvol.
5 „ „ „ „	97
3 Std. „ „ „	102,5
6 „ „ „ „	106,3
24 „ „ „ „	98,0

Wir scheinen hier also dem Entgegengesetzten von dem gegenüberzustehen, was *Knaffl-Lenz* behauptet; nehmen wir aber auch das Schwellen in Betracht, von dem wir wissen, daß es in $^{m}/_{8}$-NaCl stattgefunden hat, so ändert sich das Bild merkbar. Kontrollversuch. 3 ccm H_2O verdünnt bis zu 100 ccm mit $^{m}/_{8}$-NaCl.

Zeit nach der Vermischung	relatives Blutkörperchenvolumen
5 Minuten	100,0
3 Stunden	102,5
5 Stunden	105
24 Stunden	100,0

Aus der Vergleichung dieser beiden Versuchsreihen lernt man, daß ein 3proz. Alkohol keinen nennenswerten Einfluß auf das Blutkörperchenvolumen ausübt.

---

[1]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **171**. 1918.
[2]) *Richard Ege*, diese Zeitschr. **115**. 1921.

In dem untenstehenden Versuch ist das Blutkörperchenvolumen in der entsprechenden Salzlösung während der entsprechenden Zeit als Einheit gewählt.

Blutkörperchenvol. in 10proz. Alkohol		Blutkörperchenvol. in der Kontrollösung	
sofort	94,4	sofort	100
2 St. später	99,7	2 St. später	100

Das primäre Schrumpfen, das in dieser starken Lösung noch deutlicher ist, rührt wahrscheinlich von dem Umstand her, daß der Alkohol nicht absolut momentan in das Blutkörperchen hineindiffundiert. Die Volumenveränderungen der Blutkörperchen in Alkohol gehen also in Übereinstimmung mit der osmotischen Theorie vonstatten.

Untersuchungen über den Harnstoff ergaben gleichfalls, daß ein zu einer NaCl-Lösung gesetzter Harnstoff keinen merkbaren Einfluß auf das Blutkörperchenvolumen ausübte.

Versuch 2: $^m/_8$-NaCl, $^m/_{30}$-Harnstoff, 1 ccm Blut zu 40 ccm

	$^m/_2$-NaCl, $^m/_{22}$-Harnstoff	$^m/_2$-NaCl
8 Min. nach der Vermischung	100	100[1]
30 Min.	100,6	100,3
187 Min.	105,2	104,9
30 Stunden	104,2	104,8

Die untenstehende Tabelle gibt eine Übersicht über das prozentische Schwellen in Harnstofflösungen, im Verhältnis zu dem Blutkörperchenvolumen in NaCl-Lösungen zu demselben Zeitpunkt nach der Vermischung berechnet.

	Unmittelbar nach der Vermischung	$^1/_2$ Std. später	3 Std. später	6 Std. später	24 Std. später
$^m/_{30}$	0	+ 0,3	+ 0,3		÷ 0,6
	÷ 0,4		+ 0,4		+ 2,8
$^m/_8$	÷ 0,6			÷ 0,6	

Als Durchschnitt von sämtlichen Bestimmungen erhalten wir ein Schwellen von

$$0{,}2\% \pm 0{,}36$$

Ein zu einer NaCl-Lösung gesetzter Harnstoff übt also keinen nachweisbaren Einfluß auf das Blutkörperchenvolumen aus.

Zusammenfassung.

Diffusible Anelektrolyte (Harnstoff und Äthylalkohol) haben, sobald das Diffusionsgleichgewicht eingetreten ist, keinen Einfluß auf das Blutkörperchenvolumen.

[1]) Diese Bestimmung gilt als Einheit.

Die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für das Blutkörperchenvolumen.

VI. Mitteilung.

Studien über das osmotische Verhalten der Blutkörperchen.

Von

Rich. Ege.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 4. März 1922.)

In einer Reihe von früher veröffentlichten Aufsätzen[1]) habe ich die Momente klargelegt, die das Blutkörperchenvolumen bestimmen. Es zeigte sich, daß die Änderungen des Blutkörperchenvolumens sich im großen ganzen in befriedigender Weise erklären, wenn man davon ausgeht, daß die Blutkörperchen sich wie *Pfeffer*sche Zellen betragen, die von einer für Kationen und für eine Reihe von Anelektrolyten impermeabeln und für eine sehr große Anzahl von Anionen und für einzelne Anelektrolyte permeabeln Membrane umgeben sind; andererseits ist es aber sicher, daß die Erklärung einer Reihe von Details gegenüber nicht stichhält. Man muß daher wohl wissen, daß auch andere Momente als die osmotische Konzentration der äußeren Flüssigkeit für das Blutkörperchenvolumen Bedeutung haben können; hier ist zuvörderst an solche Momente zu denken, die die osmotische Konzentration der inneren Flüssigkeit des Blutkörpercheninhaltes beeinflussen.

Von der größten Bedeutung sind sicherlich die Änderungen der Wasserstoffionenkonzentration des Systems.

v. Limbeck[2]) und *Hamburger* haben längst dargetan, daß die Zuleitung von CO_2 eine deutliche Vermehrung des Blutkörperchenvolumens bewirkt; in einer einzelnen Arbeit hat *Hamburger*[3]) die Wirkung anderer Säuren und einiger Basen auf das Blutkörperchenvolumen untersucht

[1]) Diese Zeitschr. **115**, 109, 175; **130**, 99, 116, 132. Compt. rend. Soc. Biol. 88, 1920.

[2]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 1894, zit. nach *Hamburger*.

[3]) Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1898.

und gefunden, daß die Säure ein Schwellen, die Base ein Schrumpfen bewirkt.

Trotz der großen Rolle, die man den Säuren und Basen nach *Moore* und *Roafs* und namentlich *Fischers* Ansichten zusprechen müßte, besitzen wir keine anderen Angaben darüber, als diese ganz vereinzelten und teilweise vergessenen Messungen von *Hamburger*.

Welchen Einfluß Änderungen der Wasserstoffionenkonzentration auf das Blutkörperchen ausüben, das ergibt sich aus dem folgenden Versuch.

Versuch 1: Kaninchenblut (Oxalat).

In sämtlichen Versuchen wurden 2 ccm von folgenden Mischungen in den Hämatokritröhren zentrifugiert: 25 ccm 10proz. Rohrzucker in 1 ccm Blut und 1 ccm H_2O, Säure oder Base.

Säure, Base oder H_2O	p_H der Mischung	Volumen
H_2O	7,3	100
$^n/_{50}$-HCl	6,7	109
$^n/_{24}$-HCl	5,3	116
$^n/_{16}$-HCl	3,7	116
$^n/_{100}$-NaOH	7,6	93
$^n/_{50}$-NaOH	8,4	90
$^n/_{10}$-NaOH	10,3	88
$^n/_7$-NaOH		87,2

Um diese Volumenveränderungen beurteilen zu können, müssen wir wissen, wie große Schwankungen des Blutkörperchenvolumens durch bekannte Schwankungen der osmotischen Konzentration der äußeren Flüssigkeit bewirkt werden.

Mischt man 1 ccm Blut mit 1 ccm H_2O und 25,0 ccm 7,14proz. Rohrzucker, so erhält man ein Blutkörperchenvolumen von 134. Wir können hier durch Vergleichung mit der ersten Bestimmung in der Tabelle berechnen, wie groß die disperse Phase des Blutkörperchens in diesem Falle ist (oder wenigstens, wie groß sie zu scheinen scheint), und dadurch wieder aus dem *van't Hoff-Boyle-Mariotte*schen Gesetz, wie groß die Änderung der osmotischen Konzentration der äußeren Flüssigkeit sein muß, um dieselbe Änderung des Blutkörperchenvolumens hervorzurufen, wie eine bekannte Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration, oder wir können direkt berechnen, um wieviele osmotisch aktive Komponenten der Blutkörpercheninhalt vermehrt worden sein muß, falls diese Volumenveränderungen die osmotischen Gesetze befolgen und nicht durch eine Änderung des Imbibitionsvermögens der Kolloide hervorgerufen worden sind, von welchem Vermögen in dem Falle vorausgesetzt wird, daß es von den osmotischen Verhältnissen unabhängig ist.

Da eine Verminderung der Zuckerkonzentration der äußeren Flüssigkeit von 10% und 7,14% ein Schwellen von 24% bewirkt, wird die

folgende Gleichung einen annäherungsweisen Wert der dispersen Phase (x) des Blutkörperchens ergeben:

$$100\,(100 \div x) = 71{,}4\,(124 \div x)\,,$$

woraus sich x als etwa 50% ergibt[1]).

Die Ursache zu dem großen dispersen Volumen ist in dem Umstande zu suchen, daß die 10 proz. Rohrzuckerlösung hypertonisch ist. — Daraus findet man dann, daß eine Verschiebung des Wasserstoffionenexponenten von 7,3 auf 5,3 eine ebenso kräftige Änderung des Blutkörperchenvolumens bewirkt, wie eine Verminderung der osmotischen Konzentration der äußeren Flüssigkeit von 34%. Wir sehen mit anderen Worten, daß durch Verschiebungen der Wasserstoffionenkonzentration — die allerdings groß sind — bedeutende Schwankungen des Blutkörperchenvolumens hervorgerufen werden können.

Wie erklärt sich nun die Abhängigkeit des Blutkörperchenvolumens von der Wasserstoffionenkonzentration der äußeren Flüssigkeit? Man wird sofort bemerken, daß wir hier einer Analogie von *Fischers* Versuch über die Schwellungsveränderungen des Fibrins gegenüberstehen. Das Fibrin schwillt, indem sein Wasseraufnahmevermögen gesteigert wird, in einer sauren Flüssigkeit, und schrumpft in einer basischen, ganz wie wir dies bei den Blutkörperchen bemerkt haben. Es läßt sich daher nicht leugnen, daß *Fischer*[2]) in gewissem Maße Recht hat; er stellt aber meiner Meinung nach die Sache vollständig auf den Kopf, wenn er gar nicht zugeben will, daß die Blutkörperchen sich im großen ganzen wie *Pfeffer*sche Zellen betragen, die von einer für gewisse Stoffe impermeablen Membrane umgeben sind, und daß ihre Volumenveränderungen zuvörderst durch die osmotische Konzentration der äußeren Flüssigkeit bestimmt werden. Die meisten — ja fast alle wohlbekannten — Volumenveränderungen, denen die Blutkörperchen unterliegen, und die in einer sehr reichhaltigen Literatur untersucht und erörtert worden sind, rühren sicherlich von Änderungen des osmotischen Druckes der äußeren Flüssigkeit her und scheinen, wie in einer früher veröffentlichten Abhandlung dargetan worden ist[3]), das *van't Hoff-Mariotte*sche Gesetz zu befolgen. Nur ganz vereinzelte Volumenveränderungen, die allerdings seit vielen Jahren bekannt waren, im großen ganzen aber unberücksichtigt blieben, sind möglicherweise in Gemäßheit der von *Fischer* und anderen Forschern gefundenen Quellungs- und Schrumpfungsverhältnisse zu erklären, denen gewisse Kolloide namentlich infolge von Reaktionsänderungen unterliegen.

---

[1]) *Rich. Ege*, diese Zeitschr. **130**, 99.
[2]) Oedema and Nephritis (1915).
[3]) Diese Zeitschr. **115**. 1921.

Fischer sucht in der Regel die osmotische Membrantheorie und die Kolloidtheorie als unvereinbare Gegensätze darzustellen; es bleibt aber eine sehr große Frage, ob dies berechtigt ist, und ob diese kolloidchemischen Erscheinungen nicht vielmehr nur von speziellen osmotischen Verhältnissen herrühren. Nun ist allerdings gegeben, daß die obengenannten Schwankungen des Blutkörperchenvolumens nicht von Schwankungen der osmotischen Konzentration der *äußeren Flüssigkeit* herrühren, aber ein Schwellen der Blutkörperchen kann natürlich ebensogut von einer Vermehrung der osmotischen Konzentration des Blutkörpercheninhaltes wie von einer Verminderung der der äußeren Flüssigkeit herrühren.

Die Frage, inwiefern die beobachteten Volumenveränderungen sich durch die osmotische Theorie in befriedigender Weise erklären lassen, oder ob man zu so unbekannten Kräften wie zu der Imbibitionskraft seine Zuflucht nehmen muß, wo unter Imbibition, wohl zu bemerken, eine von den osmotischen Kräften unabhängige Wasseranziehung zu verstehen ist — diese Frage läßt sich auf experimentellem Wege beantworten.

Versuch 2: 150 ccm Kaninchenblut + 75 ccm $^{n}/_{6}$-HCl + 1200 ccm $^{m}/_{8}$-NaCl. 15 Min. geschüttelt und dann so gut wie quantitativ hinabzentrifugiert. Die Blutkörperchen gefroren und wiederholentlich bis zu absoluter totaler Hämolyse aufgetaut. Der Gefrierpunkt wurde sowohl für den Blutkörperchensaft wie für die saure Salzlösung bestimmt, in der die Blutkörperchen geschlemmt worden waren; dadurch ergab sich folgende Gefrierpunktsdepression:

Die saure Salzlösung	$\Delta = 0{,}463$
Der Blutkörperchensaft	$\Delta = 0{,}450.$

Die Übereinstimmung ist hier praktisch gesprochen dieselbe wie im Kontrollversuch, wo 150 ccm Kaninchenblut mit 1275 ccm $^{m}/_{8}$-NaCl gemischt wurden:

Die neutrale Salzlösung	$\Delta = 0{,}460.$
Der Blutkörperchensaft	$\Delta = 0{,}455.$

Was dies bedeutet, sieht man gleich ein, wenn man die Volumenveränderungen betrachtet, welche die Blutkörperchen in den 2 Lösungen sowie in NaCl-Lösungen verschiedener Konzentration durchgemacht haben.

	Blutkörperchenvol.
$^{m}/_{6}$-NaCl	100
$^{m}/_{10}$-NaCl	132,8
$^{m}/_{12}$-NaCl	157,8 schwache Häm.
1 Teil H_2O + 15 $^{m}/_{8}$-NaCl	118,8[1])
1 Teil $^{n}/_{6}$-HCl + 15 $^{m}/_{8}$-NaCl	155,7[1])

[1]) Von diesen Mischungen entspricht die letztere genau der sauren Salzlösung, in der die Blutkörperchen geschlemmt und die Gefrierpunktsdepression des Blutkörperchensaftes bestimmt wurde, die erste entspricht genau der neutralen Kontrollsalzlösungen.

Trotzdem die Blutkörperchen infolge der Reaktionsänderung von **118,8 auf 155,7 geschwollen sind, was bedeutet, daß der Blutkörperchensaft 31% H_2O aufgenommen hat, ist die osmotische Konzentration des Blutkörperchensaftes doch praktisch gesprochen unverändert.**

Die Erklärung des Schwellens der Blutkörperchen in der sauren Salzlösung muß also darin liegen, daß neue osmotisch aktive Komponenten von sehr bedeutender Anzahl gebildet worden sind: wie groß die von den neugebildeten Komponenten vertretene molare Konzentration ist, läßt sich aus dem Schwellen berechnen, sobald man die Wasserphase des Blutkörperchens kennt; diese wird in der gewöhnlichen Weise berechnet[1]) **und beträgt für das Blutkörperchen in** $^m/_6$**-NaCl-Lösung etwa 61%;** in der „$^m/_8$"-NaCl-Lösung, in der der Versuch angestellt wurde und in der die Blutkörperchen **etwa 19%** schwollen, muß die Wasserphase etwa 80% betragen.

Die Blutkörperchen, in denen also etwa 80% aus Lösungsmittel bestehen, saugen 31% Wasser ein, ohne daß sich die osmotische Konzentration des Blutkörperchensaftes ändert; es müssen sich daher soviele osmotisch aktive Komponenten gebildet haben, daß die molare Konzentration die folgende ist:

$$\frac{31}{80} \cdot \frac{0,460}{1,85} \text{ Mol} = \text{etwa } ^m/_{10} \,.$$

Wir können leicht beurteilen, inwiefern ein solcher neuer Zuwachs durch eine Änderung der Molekülformel des Hämoglobins — in diesem Falle also durch eine Spaltung — entstanden sein kann.

Wie groß das Hämoglobinmolekül unter verschiedenen Verhältnissen ist oder sein kann, ist noch nicht entschieden, die kleinste mögliche Molekülzahl kann aber von 16 000 nicht weit entfernt sein; nun kann der Hämoglobinprozentsatz in normalen Blutkörperchen höchstens zu 40% angesetzt werden: das Hämoglobin im Blutkörperchen hat somit höchstens eine osmotische Konzentration von

$$\frac{400}{16{,}000} = {}^1/_{40} \text{ Mol} = \text{etwa } {}^1/_2 \text{ Atm. Druck.}$$

In diesem Falle, in dem die disperse Phase infolge des Schwellens auf etwa die Hälfte gesunken ist, wird der osmotische Partialdruck des Hämoglobins höchstens etwa $^1/_4$ Atm. ausmachen.

Solange das Hämoglobin also nicht geschädigt wird, kann der partielle osmotische Druck des Hämoglobins selbst — bei Änderungen des Dispersitätsgrades — von $^1/_2$ Atm. Druck nach unten hin schwanken und somit nicht die Ursache davon sein, daß die osmotische Konzentration des Blutkörpercheninhalts um etwa $^1/_{10}$ Mol = etwa 2 Atm.

---

[1]) Diese Zeitschr. **130**, 99.

steigt (was allerdings durch Verdünnung ausgeglichen wird). Die Vermehrung der Anzahl der osmotisch aktiven Komponenten muß daher sicherlich von den Ampholytencharakter des Hämoglobins und dessen daraus folgender Puffereigenschaft herrühren.

Dagegen verstehen wir jetzt, daß die Blutkörperchen in einer Rohrzuckerlösung, zu der saure Ammoniaksalze gesetzt worden sind, über das ursprüngliche Volumen in der Rohrzuckerlösung hinaus anschwellen, während sie nicht bis aufs Maximum schwellen, wenn das zugesetzte NH_4-Salz eine basische Reaktion hat[1]).

Schließlich müssen wir behaupten, daß das Blutkörperchenvolumen nicht ausschließlich durch den osmotischen Druck der äußeren Flüssigkeit bestimmt ist, weshalb es nicht wundernehmen kann, daß es einzelne Schwankungen des Blutkörperchenvolumens gibt, die wir noch nicht zu erklären vermögen.

Zusammenfassung.

1. Die Änderungen der Wasserstoffionenkonzentration der äußeren Flüssigkeit haben einen sehr bedeutenden Einfluß auf das Blutkörperchenvolumen.

2. Je größer die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung ist (bis auf p_H = etwa 5), um so größer ist das Blutkörperchenvolumen; je geringer die Wasserstoffionenkonzentration ist (bis auf $p_H = 10$), um so kleiner ist das Volumen.

3. Das Schwellen der Blutkörperchen in einer sauren Flüssigkeit befolgt die gewöhnlichen osmotischen Gesetze und rührt von der Vermehrung der osmotisch aktiven Komponenten her, die infolge des Säurezusatzes im Innern des Blutkörperchens entsteht.

---

[1]) *Rich. Ege*, diese Zeitschr. **130**, 116.

Bemerkungen zu der Arbeit von M. Bürger: Über die Wirkung der intravenösen Injektion hypertonischer Lösungen verschiedener Zuckerarten auf den respiratorischen Stoffwechsel des Hundes[1].

Von

W. Falta.

(Aus der III. med. Abteilung des Kaiserin Elisabethspitales in Wien.)

(Eingegangen am 5. März 1922.)

In Bd. **124** dieser Zeitschrift hat *M. Bürger* Versuche über die Wirkung der intravenösen Injektion hypertonischer Zuckerlösungen mitgeteilt, von deren Ergebnissen ich hier nur die beiden folgenden erwähnen möchte: daß neben dem Ansteigen des respiratorischen Quotienten eine Steigerung der Wärmebildung auftritt und daß das Ansteigen des R. Q. auch dann erfolgt, wenn die Glykogenspeicher durch vorhergehende Kohlenhydratentziehung und Muskelarbeit vermindert sind. *M. Bürger* schließt daraus, daß die Glykogenarmut den intravenös injizierten Zucker nicht vor der Verbrennung schützt und daß es trotzdem zu einer „luxurierenden Zuckerverbrennung" kommt.

Im Jahre 1918 haben *S. Bernstein* und ich[2] über eine Reihe analoger Versuche berichtet, die dem Verfasser obigen Artikels entgangen zu sein scheinen, weshalb ich mir unsere Resultate, soweit sie hier von Interesse sind, auch an dieser Stelle kurz wiederzugeben erlauben möchte.

1. Bei normalen Individuen fand sich nach intravenöser Injektion isotonischer wie hypertonischer Traubenzuckerlösungen Ansteigen des R. Q. „auch dann, wenn der Bestand der Glykogenspeicher durch vorausgehende kohlenhydratfreie Kost stark vermindert worden war. Bei diabetischen Individuen trat ein Ansteigen des R. Q. nur bei leichten Fällen und auch dann nur in viel geringerem Maße auf, bei schweren Fällen wurde es vermißt.

2. Sowohl bei normalen wie bei diabetischen Individuen trat eine Steigerung der Wärmebildung bei Verwendung pasteurisierter Lösungen *nicht* auf, hingegen bei Verwendung hypertonischer durch Kochen sterilisierter Zuckerlösungen. In der Deutung der letzterwähnten Versuche waren wir aus Gründen, die in der Originalarbeit nachgelesen werden mögen, sehr vorsichtig. *Jedenfalls zeigen alle unsere Untersuchungen am Menschen eine weitgehende Übereinstimmung mit denen am Hund von M. Bürger.*

[1] Diese Zeitschr. **124**, 1.

[2] *S. Bernstein* und *W. Falta*, Dtsch. Arch. f. klin. Med. **125** und ebenda **127**. 1918.

Zur Ausführung und Berechnung von Stoffwechselversuchen mit Wiederkäuern.

Von

A. C. Andersen.

(Aus der landwirtschaftlichen Versuchsstation der Königlichen Dänischen landwirtschaftlichen und tierärztlichen Hochschule Kopenhagen.)

(Eingegangen am 6. März 1922.)

Die Wärmeproduktion eines Tieres bei gegebenem Futter läßt sich bekanntlich aus dem respiratorischen Gaswechsel berechnen, wenn die notwendigen experimentellen Daten vorliegen. Beim Menschen wie bei vielen Tieren genügt es, Kenntnis von der Kohlensäureproduktion, dem Sauerstoffverbrauch und der durch den Harn ausgeschiedenen Stickstoffmenge zu haben, um die Berechnung durchzuführen. Aus der Stickstoffmenge ergibt sich nämlich die oxydierte Eiweißmenge, und hieraus folgt weiter die dazu verwendete Sauerstoffmenge wie die gebildete Kohlensäuremenge. Der Rest der gebildeten Kohlensäure und des verbrauchten Sauerstoffs rührt von der Oxydation der stickstofffreien Bestandteile des Futters her, und das Verhältnis dieser beiden Größen gibt somit den respiratorischen Quotienten dieser Bestandteile; mittels einer von *Zuntz* aufgestellten Tabelle über den kalorischen Wert des Sauerstoffs bei verschiedenen respiratorischen Quotienten läßt sich hieraus leicht die Wärmeproduktion der umgesetzten stickstofffreien Futteranteile berechnen, und Addition der Wärmebildung bei der Eiweißoxydation liefert dann die gesammte produzierte Wärmemenge.

Wenn es sich um Tiere mit starker Gärung im Verdauungskanal, besonders um Wiederkäuer handelt, liegt aber die Sache nicht so einfach. Bei der Gärung wird nämlich Kohlensäure und Methan gebildet, und eine Bestimmung der Wärmeproduktion direkt nach der obenerwähnten Methode führt dann zu ganz falschen Resultaten, weil ein Teil der gebildeten Kohlensäure nicht der eigentlichen Verbrennung im Tierkörper, sondern der Gärung entstammt. Um bei solchen Tieren eine Berechnung der Wärmeproduktion zu ermöglichen, haben *Zuntz* und seine Mitarbeiter bekanntlich eine Bestimmung des eigentlichen respiratorischen Gaswechsels dadurch erzielt, daß sie mittels einer Tracheal-

kanüle die Gase der Lungenrespiration von den aus dem Verdauungskanal kommenden Gasen trennten; sie rechneten dann, daß das obenerwähnte Berechnungsverfahren anwendbar war, wenn man nur mit der durch die Kanüle ausströmenden statt mit der gesamten produzierten Kohlensäuremenge rechnete.

Wenn es sich nur um vereinzelte Laboratoriumsversuche handelt, läßt sich ja eine Versuchsanordnung wie die erwähnte ohne besondere Schwierigkeiten durchführen; größere Untersuchungsreihen mit vielen Tieren sind dagegen nur schwer durchführbar. Auch ist kein eigentlicher Beweis geliefert, daß die Kohlensäuremenge, die aus der Kanüle strömt, genau der Kohlensäuremenge entspricht, die bei der Verbrennung im Organismus wirklich gebildet ist, und ein solcher Beweis läßt sich wohl überhaupt nicht erbringen. Denn aus dem Verdauungskanal wird ja immer sowohl Methan wie auch Kohlensäure resorbiert, und die resorbierten Gase gelangen später zur Ausscheidung durch die Lungen.

Für das Methan hat sich nach einigen im *Zuntz*schen Laboratorium von *Klein* angestellten Versuchen ergeben, daß etwa $^1/_3$ des gesamten gebildeten Methans resorbiert und durch die Lungen ausgeatmet wird; noch nicht publizierte, im hiesigen Institute ausgeführte Versuche haben ungefähr denselben Wert ergeben.

Was die Kohlensäuremenge betrifft, die, im Verdauungsapparat gebildet, zur Resorption gelangt, um durch die Lungen ausgeatmet zu werden, so ist sie wohl kaum zu bestimmen. Übrigens ist es ja so, daß sie teils durch eine etwaige Hautrespiration, teils auch durch das folgende Verhalten kompensiert wird. Eine erhebliche Menge der im ganzen gebildeten Kohlensäure ist nicht direkt durch Gärung entstanden, sondern dadurch, daß bei der Gärung Säuren entstehen, die von den Carbonaten des Speichels unter Kohlensäureentwicklung neutralisiert werden. Wenn die gebildeten Säuren als solche resorbiert wurden, mußte bei vollständiger Verbrennung ihre ganze Kohlenstoffmenge als Kohlensäure durch die Lungen erscheinen; nachdem sie aber im Pansen oder in der Mundhöhle während des Wiederkauens, d. h. außerhalb des Organismus, neutralisiert und dann als Salze resorbiert werden, wird ein Teil ihres Kohlenstoffs als Carbonat im Blute zurückgehalten. Es ist daher ohne weiteres klar, daß die unter diesen Umständen durch die Lungen ausgeatmete Kohlensäuremenge geringer sein werde als diejenige, die der Verbrennung wirklich entspricht, wenn eine Kompensation durch Resorption von Kohlensäure aus dem Verdauungskanal nicht stattfand. Ein Beweis dafür, daß diese Fehlerquellen unter allen Umständen einander eben kompensieren, läßt sich natürlich kaum erbringen.

Noch eins muß erwähnt werden. Die *Zuntz*sche Tabelle über den kalorischen Wert des Sauerstoffs bei verschiedenen respiratorischen

Quotienten ist abgeleitet unter der Voraussetzung, daß die stickstofffreien Stoffe, die im Organismus verbrennen, entweder den Fetten oder den Kohlenhydraten gehören. Ob es richtig ist, die Zahlenangaben der Tabelle zu benutzen, wenn die verbrannten Körper Gärungsprodukte mit anderen respiratorischen Quotienten und anderen Werten der Verbrennungswärme gewesen sind als die zugrunde gelegten, muß zweifelhaft erscheinen. *Zuntz* hat schon längst darauf aufmerksam gemacht und mit seinen Mitarbeitern Untersuchungen zur Aufklärung dieser Frage angestellt; sie meinen hieraus feststellen zu können, daß die Tabelle auch in dem erwähnten Falle angewendet werden kann, ohne größere Fehler zu verursachen. Wenn dies nun auch richtig ist, so bleibt doch hier wie bei der Bestimmung der respiratorischen Quotienten immer eine Unsicherheit vorhanden. Es wäre deshalb von Bedeutung, ein Berechnungsverfahren zu haben, das ohne die erwähnten Fehlerquellen zu demselben Ziel führt. Ein solches Verfahren soll unten mitgeteilt werden.

Alle Schwierigkeiten rühren davon her, daß bei der Gärung unvollständige, luftförmige Verbrennungsprodukte, vor allem Methan, gebildet werden, die verloren gehen; wenn nur sämtliche Gärungsprodukte vollständig verbrannten, dann ließe sich die anfangs erwähnte Methode ebenso sicher bei Versuchen mit Wiederkäuern wie bei Versuchen mit Menschen und Fleischfressern anwenden, denn wenn z. B. eine Portion Zucker vollständig verbrannt wird, ist ja die produzierte Wärmemenge von den Zwischenprodukten des Verbrennungsprozesses ganz unabhängig. Weil nun Methan als das sozusagen einzige, unvollständige, luftförmige Verbrennungsprodukt angesehen werden kann — von der Möglichkeit des Vorkommens von Wasserstoff siehe weiter unten —, dann läßt sich das hier Gesagte auch in der Weise formulieren, daß die erwähnte einfache Methode sich ohne weiteres anwenden ließe, wenn nur auch das bei der Gärung entstandene Methan im Tierkörper vollständig verbrannte. Dies läßt sich natürlich nicht erreichen; wenn man aber die erzeugte Methanmenge kennt, kann man mit der Verbrennung des Methans *rechnen* und dadurch zum Ziel gelangen, wenn nur 1. die durch den Harn ausgeschiedene Stickstoffmenge, 2. die ganze produzierte Kohlensäuremenge, 3. der gesamte Sauerstoffverbrauch und 4. die ganze gebildete Methanmenge bekannt sind. Eine Trennung der durch die Gärung im Verdauungsapparat und durch die Verbrennung im Organismus gebildeten Gase ist dagegen nach diesem Verfahren nicht erforderlich, und die Anwendung von tracheotomierten Tieren ist somit jetzt unnötig.

Das Verfahren gestaltet sich wie folgt:

Auf Grund der im Harn enthaltenen Stickstoffmenge wird die abgebaute Proteinmenge und daraus wieder die beim Verbrennen des

Proteins gebildete Kohlensäuremenge sowie die verbrauchte Sauerstoffmenge berechnet; der Rest der gefundenen Kohlensäureproduktion und des gefundenen Sauerstoffverbrauchs rührt dann von den stickstofffreien Stoffen her. Nehmen wir nun an, das Methan brenne; die Kohlensäuremenge, die dadurch entstehen würde, sowie die Sauerstoffmenge, die gleichzeitig verbraucht werden würde, ergibt sich direkt aus der bekannten Methanmenge, denn 1 Mol. Methan verbraucht ja 2 Mol. Sauerstoff und bildet dadurch 1 Mol. Kohlensäure. Werden die in dieser Weise gefundenen Werte bzw. zu der Kohlensäureproduktion und zu dem Sauerstoffverbrauch addiert, die für stickstofffreie Stoffe wie obenerwähnt gefunden wurden, so ergeben sich diejenigen Werte der genannten Größen, die sich beim Versuch ergeben hätten, falls auch das Methan verbrannt wäre. Diese Werte von Kohlensäureproduktion und Sauerstoffverbrauch ist man nun berechtigt, zur Berechnung der Wärmeproduktion mittels der *Zuntz*schen Tabelle zu benutzen, denn unter der genannten Voraussetzung, daß auch das Methan verbrannt ist, ist es doch eine Mischung von Fett und Kohlenhydrat, die vollständig oxydiert worden ist. Die in dieser Weise berechnete Wärmeproduktion ist also diejenige, die sich ergeben hätte, wenn auch das Methan verbrannt wäre; sie ist somit größer als die tatsächliche, und zwar um so viel, wie der Verbrennungswärme der in Frage stehenden Methanmenge entspricht. Da die Methanmenge aber bekannt ist, läßt sich die Verbrennungswärme derselben leicht direkt berechnen, und wenn der so gefundene Wert abgezogen wird, erhält man folglich die tatsächliche Wärmeproduktion des Tieres beim Verbrennen stickstofffreier Stoffe. Addiert man schließlich dazu die beim Verbrennen der Proteine entwickelte Wärmemenge, so hat man die gesamte Wärmeproduktion des Versuchstieres unter den gegebenen Umständen.

Um das Verfahren ganz klarzustellen, werden hier die Berechnungen eines Versuchs wiedergegeben, wo das Tier sich in Ernährungsgleichgewicht befand. Die angegebenen Versuchsdaten stammen aus einigen Versuchen, die in der Tierphysiologischen Abteilung des hiesigen Institutes von *H. Möllgaard* und mir ausgeführt worden sind; sämtliche Angaben beziehen sich auf 24 Stunden. Die Zahlen sind Durchschnittswerte. Der Harnstickstoff repräsentiert eine Periode von 28 Tagen, nachdem das Tier sich durch eine Vorperiode von 2—3 Wochen auf das Futter eingestellt hatte; die Daten des Respirationsgaswechsels sind Durchschnitt von 6 Bestimmungen, wovon jede 24 Stunden andauerte. Das Versuchstier war eine Geltkuh.

Das Tier erhielt im Futter 16 998 Cal., von denen 8606 mit Kot, Harn, Methan usw. verloren gingen; die Wärmeproduktion des Tieres beträgt somit, in dieser Weise bestimmt, 8392 Cal.

Der Harn enthielt 32,2 g Stickstoff, was 193,2 g Protein entspricht;

zur Oxydation im Organismus erfordert diese Proteinmenge 187 Liter Sauerstoff, wodurch dann 151 Liter Kohlensäure gebildet und 858 Cal. entwickelt werden.

Im ganzen wurde ein Verbrauch von 1638 Liter Sauerstoff und eine Bildung von 1734 Liter Kohlensäure und 127 Liter Methan gefunden, was somit für die stickstofffreien Stoffe 1638 ÷ 187 = 1451 Liter Sauerstoff und 1734 ÷ 151 = 1583 Liter Kohlensäure sowie 127 Liter Methan entspricht.

Nehmen wir nun an, das Methan brenne. Die Gleichung

$$CH_4 + 2\,O_2 = CO_2 + 2\,H_2O$$

zeigt, daß 127 Liter Methan sich mit 254 Liter Sauerstoff verbinden unter Bildung von 127 Liter Kohlensäure. Die gesamte Kohlensäureproduktion der stickstofffreien Stoffe würde dann 1583 + 127 = 1710 Liter und der Sauerstoffverbrauch 1451 + 254 = 1705 Liter betragen, was einem respiratorischen Quotienten von 1710 : 1705 = 1,003 entspricht. Hieraus berechnet sich weiter nach den *Zuntz*schen Prinzipien eine Wärmebildung von 8610 Cal.

In diesem Wert ist die beim Verbrennen des Methans gebildete Wärmemenge eingeschlossen, was 1207 Cal. entspricht. Die im Tierkörper bei der Umsetzung von stickstofffreien Stoffen wirklich entstandene Wärmemenge beträgt somit 8610 ÷ 1207 = 7403 Cal.

Bei der Verbrennung des Proteins wurden, wie oben erwähnt, 858 Cal. gebildet, und die gesamte Wärmebildung des Versuchstieres wird somit zu 7403 + 858 = 8261 Cal. gefunden, was mit dem obenerwähnten durch indirekte Biocalorimetrie, d. h. in ganz anderer Weise gefundenen Wert von 8392 Cal. befriedigend übereinstimmt; die Differenz beträgt ja nur 1,6% des Wertes.

Es wird oft angegeben, daß außer Methan noch Wasserstoff bei der Gärung im Pansen des Wiederkäuers entsteht. Bei den von *Möllgaard* und mir ausgeführten Versuchen haben wir jedoch eine Wasserstoffbildung nicht konstatieren können. Wenn aber etwas Wasserstoff gefunden werden sollte, kann es ja in entsprechender Weise wie das Methan leicht in die Rechnung gezogen werden.

Die oben öfters erwähnte *Zuntz*sche Tabelle enthält die Angaben des kalorischen Wertes des Sauerstoffs bei einigen respiratorischen Quotienten zwischen 0,71 und 1,00. Bei der praktischen Anwendung der Tabelle muß man aber fast immer interpolieren. Wenn viele Untersuchungen zu bearbeiten sind, ist es daher vorteilhafter, die *Zuntz*sche Berechnungsweise in einer Gleichung statt in einer Tabelle auszudrücken, was natürlich ohne weiteres durchführbar ist. *Zuntz* und *Schumburg*

haben aber bei der Aufstellung ihrer Tabelle für die Zusammensetzung und übrigen Werte des Fettes die Daten des Menschenfettes gewählt; wenn nun auch die Werte für verschiedene Fette nicht stark abweichen, und wenn diese Abweichungen noch dadurch von geringerer Bedeutung werden, daß die Fette gewöhnlich einen verhältnismäßig kleinen Anteil des gemischten Futters ausmachen, so scheint es doch besser, mit Fetten von durchschnittlicher Zusammensetzung zu rechnen. Die Tabelle von *Zuntz* und *Schumburg* haben wir daher bei unseren Versuchen immer durch die folgende Gleichung ersetzt:

Kalorischer Wert pro Liter Sauerstoff $= 4{,}686 + 1{,}23 \cdot (Q \div 0{,}707)$, wo Q den respiratorischen Quotienten der umgesetzten stickstofffreien Stoffe bedeutet[1]).

Diese Gleichung ist wie die mit ihr prinzipiell gleiche *Zuntz*sche Tabelle anwendbar bei allen Versuchen, wo der respiratorische Quotient zwischen 0,707 und 1,000 liegt. In solchen Fällen aber, wo durch ein reichliches, aber sehr fettarmes Futter eine erhebliche Fettbildung im Tierkörper stattfindet, wo das Fett somit aus Kohlenhydraten entstehen muß, wird man respiratorische Quotienten finden, die größer, öfters zwar viel größer als 1,00 sind. Wie man in solchen Fällen die Wärmebildung berechnen soll, war bis jetzt etwas zweifelhaft. Natürlich konnte man immer über den Rahmen der *Zuntz*schen Tabelle hinaus extrapolieren, was zwar sehr einfach ist, wenn die Angaben der Tabelle wie oben in einer Gleichung ausgedrückt werden; ob der in dieser Weise erhältliche Wert der Wärmebildung der richtige wäre, ließe sich aber nicht sagen. Um die Unsicherheit, die auf diesem Gebiet herrscht, anzudeuten, soll nur zitiert werden, was *Eckstein* und *Grafe* im Jahre 1919 darüber schreibt: „Da das kalorische Äquivalent eines Liter Sauerstoffs bei einem Quotienten über 1,0 immer noch nicht bekannt ist, läßt sich auch, wenn beide Gase analysiert werden, die Wärmeproduktion nicht genau berechnen. Wir haben, wohl ohne einen großen Fehler zu begehen, in solchen Fällen für die Berechnung den Wert für 1,0 (5,058 Cal. pro 1 Liter Sauerstoff) genommen[2])." Diese beiden Forscher haben somit vorgezogen, statt eine Extrapolation vorzunehmen, mit dem höchsten Wert der *Zuntz*schen Tabelle zu rechnen.

Auch hier läßt sich aber mit der neuen Methode eine Aufklärung herbeischaffen. Man braucht ja nur, dem Verfahren beim Methan entsprechend, zu supponieren, das Fett brenne, und in dieser Voraussetzung die Wärmeproduktion zu berechnen; aus dem so gefundenen

---

[1]) Siehe *H. Möllgaard* und *A. C. Andersen*, Methodische und technische Beschreibung eines Pettenkoferschen Respirationsapparates für Versuche mit melkenden Kühen. Jahresschrift der Kgl. Dänischen Landwirtschaftl. und Tierärztl. Hochschule 1917, S. 292. (Dänische Sprache.)

[2]) *E. Eckstein* und *E. Grafe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 85. 1919. (Fußnote).

Wert ergibt sich dann nach Subtraktion der beim Verbrennen des Fettes gebildeten Wärmemenge die wirkliche Wärmeproduktion des Tieres bei der Oxydation von stickstofffreien Stoffen. Es hat sich nun gezeigt, daß man dieselbe Wärmeproduktion findet, sei es, daß man wie hier auseinandergesetzt rechnet, oder sei es, daß man einfach mit der Gültigkeit der obenerwähnten Gleichung auch bei respiratorischen Quotienten größer als 1,00 rechnet. Hieraus muß dann gefolgert werden, daß das letztgenannte, einfache Verfahren zulässig ist.

Ein Beispiel wird die Einzelheiten einer solchen Berechnung verständlich machen.

In einem wie oben kurz beschrieben durchgeführten Versuch war das Futter sehr fettarm, wurde aber sehr reichlich zugemessen; im ganzen wurde pro Tag nur 78 g Fett resorbiert, während im Körper 424 g Fett abgelagert wurden, so daß mindestens 346 g Fett aus anderen Stoffen gebildet sein mußten. Der respiratorische Quotient der verbrannten stickstofffreien Stoffe zeigte sich demnach auch erheblich größer als 1.

Durch calorimetrische Bestimmung vom Futter, Kot, Harn usw. ergab sich, daß die Wärmebildung im Tierkörper 11 898 Cal. betrug.

Der Harn enthielt 58,7 g Stickstoff, 352,2 g Protein entsprechend; zur Oxydation hat diese Menge 342 Liter Sauerstoff erfordert, wodurch unter Bildung von 275 Liter Kohlensäure 1564 Cal. erzeugt worden sind.

Im ganzen wurde ein Verbrauch von 2254 Liter Sauerstoff und eine Produktion von 2709 Liter Kohlensäure und 240 Liter Methan gefunden; aus stickstofffreien Stoffen sind somit 2709 ÷ 275 = 2434 Liter Kohlensäure und 240 Liter Methan unter Aufnahme von 2254 ÷ 342 = 1912 Liter Sauerstoff gebildet worden.

1. Berechnungsverfahren. Wenn das Methan verbrannt wäre, wären hierdurch 240 Liter Kohlensäure unter Verbrauch von 480 Liter Sauerstoff entstanden. Gefunden wäre dann eine Kohlensäureproduktion von 2434 + 240 = 2674 Liter und ein Sauerstoffverbrauch von 1912 + 480 = 2392 Liter, d. h. ein respiratorischer Quotient von 2674 : 2392 = 1,118. Aus der obenerwähnten Gleichung ergibt sich dann eine Wärmeproduktion von

$$2392 \cdot (4{,}686 + 1{,}23 \cdot 0{,}411) = 12\,418 \text{ Cal.}$$

und hieraus weiter nach Subtraktion der Verbrennungswärme des Methans und Addition der vom Protein erzeugten Wärmemenge eine Wärmebildung im Tierkörper von

$$12\,418 \div 2281 + 1564 = 11\,701 \text{ Cal.}$$

Diese Berechnung ist, wie ersichtlich, durchgeführt von der Voraussetzung ausgehend, daß die nach den *Zuntz*schen Prinzipien aufgestellte Gleichung auch Gültigkeit hat bei respiratorischen Quotienten, die

größer als 1,00 sind. Es ergibt sich, daß die gefundene Wärmeproduktion mit dem in anderer Weise erhaltenen Wert 11 898 Cal. (siehe oben) befriedigend übereinstimmt.

2. *Berechnungsverfahren.* Rechnen wir nun, wie oben besprochen, daß außer dem Methan noch das abgelagerte Fett brenne. Aus 424 g Fett entstehen beim Verbrennen 606 Liter Kohlensäure unter Freigabe von 4011 Cal., während 856 Liter Sauerstoff verbraucht werden. Wir finden somit eine Produktion von

$$2709 \div 275 + 240 + 606 = 3280 \text{ Liter Kohlensäure}$$

und einen Verbrauch von

$$2254 \div 342 + 480 + 856 = 3248 \text{ Liter Sauerstoff,}$$

was einem respiratorischen Quotienten von 3280 : 3248 = 1,010 entsprechen würde.

Weiter finden wir

Die supponierte Wärmeproduktion: 3248 · (4,686 + 1,23 · 0,303) =	16431 Cal.
÷ die Verbrennungswärme des Fettes	4011 Cal.
÷ die Verbrennungswärme des Methans	2281 Cal.
	10139 Cal.
+ die Verbrennungswärme des Proteins	1564 Cal.
	11703 Cal.

oder ganz denselben Wert wie bei dem ersten Verfahren, dessen Zulässigkeit somit hierdurch bestätigt wird.

Zusammenfassung.

1. Es wird ein Berechnungsverfahren mitgeteilt, das es ermöglicht, die Berechnung der Wärmebildung bei Stoffwechselversuchen mit Wiederkäuern durch Kenntnis der Stickstoffmenge des Harns, des Sauerstoffsverbrauchs, der im ganzen gebildeten Kohlensäuremenge und der bei der Gärung entstandenen Methanmenge durchzuführen. Eine Sonderung der durch die Gärung im Verdauungskanal und durch die Verbrennung im Organismus gebildeten Gase ist dagegen nicht erforderlich, und das Tracheotomieren der Versuchstiere ist somit nicht notwendig.

2. Es wird durch das Berechnungsverfahren erwiesen, daß man auch dann die Wärmeproduktion eines Tieres sicher berechnen kann, wenn der respiratorische Quotient wegen Fettbildung im Organismus größer als 1 sich herausstellt.

Hat die intrathorakale, doppelseitige Durchschneidung des Grenzstranges des Sympathicus einen Einfluß auf die Magensekretion?

Von

B. Ishido (Japan).

(Aus der Experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Institutes der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 6. März 1922.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In seiner Arbeit „Über die Folgen der Vagusdurchschneidung, insbesondere ihre Wirkung auf die Funktionen des Magens" teilte *Litthauer*[1]) aus dem hiesigen Laboratorium Versuche mit, aus denen hervorgeht, daß nach der doppelseitigen, intrathorakalen Vagotomie oberhalb des Zwerchfells die Magensaftsekretion in dem Sinne geändert wird, daß die Sekretionskurve nach einer bestimmten Probemahlzeit verlängert ist, einen unregelmäßigen Ablauf zeigt, besonders in dem Sinne, daß der initiale Anstieg der Kurve langsamer als in der Norm erfolgt, daß auch im späteren Verlauf unregelmäßige Erhebungen und Senkungen im Kurvenbilde auftreten, und daß dabei oft die Gesamtsumme des Magensaftes, der am *Pawlow*schen Magenblindsack gemessen wurde, beträchtlich größer als in der Norm ist. Ferner zeigt der Magen eine kontinuierliche Sekretion, d. h. auch im nüchternen Zustand wird Saft abgesondert.

Aus alledem geht hervor, daß der Vagusstamm im Brustkorbe vor allem sekretionshemmende Fasern führt, deren Funktionsausfall den Sekretionsanstieg zum größten Teile erklärt, und daß der gleichzeitige Ausfall sekretionsfördernder Fasern, die wir nach den *Pawlow*schen Versuchen ebenfalls im Vagus vermuten dürfen, höchstens sich ausdrückt in dem langsamen initialen Anstieg der pathologischen Sekretionskurven.

Es lag nun nahe, auch einmal zu prüfen, ob die doppelseitige Durchschneidung des Grenzstranges des Sympathicus innerhalb des Thorax einen Einfluß auf die Magensaftsekretion erkennen läßt.

---

[1]) Arch. f. klin. Chirurg. **113**, Heft 3.

Zu diesem Zwecke habe ich auf Veranlassung von Herrn Professor *Bickel* folgenden Versuch angestellt.

Einem großen Hunde wurde ein *Pawlow*scher Magenblindsack angelegt. Dann wurde die Sekretionskurve am Magenblindsack aufgezeichnet nach der Gabe der bestimmten Probemahlzeiten. Etwa 4 Wochen später wurde bei dem Tiere unter Anwendung der Insufflationsnarkose linksseitig der Thorax geöffnet, der linke Grenzstrang des Sympathicus in der Höhe zwischen 8. und 9. Brustwirbel durchschnitten, und gleichzeitig wurde, was vorher technisch als unmöglich galt, durch den tastenden Finger des Operateurs der rechte Grenzstrang nach Loslösung der großen Gefäße und des Oesophagus von den Wirbelkörpern in der Rippenhöhlung der rechten Körperseite dicht hinter den ihn verdeckenden Wirbelkörpern aufgesucht, ohne Kontrolle des Auges auf einen stumpfen Haken gelegt, hervorgezogen und unter der Kontrolle des Auges durchschnitten.

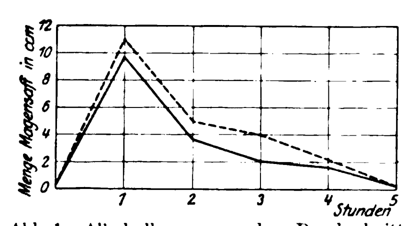


Abb. 1. Alkoholkurven aus dem Durchschnitt aller Versuche. - - - - vor der Sympathicusdurchschneidung. ——— nach der Sympathicusdurchschneidung.

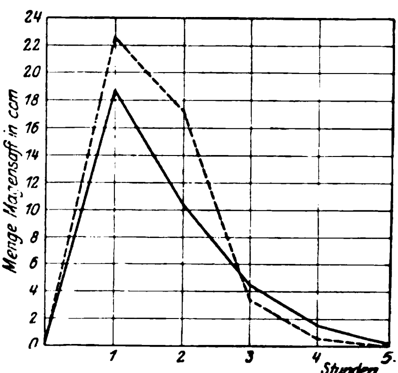


Abb. 2. Fleisch-Cenoviskurven aus dem Durchschnitt aller Versuche. - - - - vor der Sympathicusdurchschneidung. ——— nach der Sympathicusdurchschneidung.

Nachdem das Tier sich von dieser Operation erholt hatte, wurde wieder die Sekretionskurve am Magenblindsack nach der Gabe der gleichen Probemahlzeiten aufgenommen. Nach einigen Wochen wurde durch Obduktion in vivo festgestellt, daß auch der rechte Grenzstrang regelrecht durchschnitten war.

Das Resultat war, daß die doppelseitige, intrathorakale Durchschneidung des Grenzstrangs des Sympathicus, wenn überhaupt, so nur einen geringen hemmenden Einfluß auf den Ablauf der Magensaftsekretion hat. Eine Verkürzung der Sekretionsperiode trat nicht auf, sondern nur eine geringe Herabsetzung in den Sekretmengen nach Ausweis der Durchschnittskurven aller Versuche. Umgekehrt trat nach der doppelseitigen Vagotonie bei den *Litthauer*schen Versuchen eine sehr erhebliche Steigerung in der Sekretionsarbeit auf. Dem Maße dieser Steigerung entspricht nicht der Grad der Hemmung bei meinen Versuchen. Offenbar erhält der Magen auch noch auf anderen Wegen genug hemmende Fasern, so daß die von mir vorgenommene Sympathicotomie nur ge-

ringen Einfluß hat. Aber auch dieser Ausfall des Versuchs involviert eine Bereicherung unserer Kenntnisse über den Sekretionsmechanismus und die Nervenbahnen, die ihm zu Gebote stehen. Zudem ist die Versuchsanordnung, vom technisch-operativen Standpunkte aus betrachtet, eine so schwierige, daß schon die Mitteilung des Versuchs lohnt, um anderen Autoren, die sich etwa in Zukunft mit dieser Frage beschäftigen sollten, die Mühe zu ersparen.

Endlich wird es von Interesse sein, davon Kenntnis zu nehmen, daß die *doppelseitige*, intrathorakale Durchschneidung des Grenzstranges möglich ist, wenn man den Thorax nur *einseitig* öffnet.

Versuchsprotokoll.

25. I. 1922. Operation der Anlegung des Pawlowschen Magenblindsacks.

4. II. 1922. 10 ccm Alkohol ad 140 ccm Wasser durch die Sonde in den nüchternen großen Magen als Probekost gegeben. Halbstündlicher Sekretionsablauf: 6,9 — 4,1 — 2,0 — 3,2 — 1,9 — 2,1 — 1,0 — 1,3 — 0,7 — 0,1 ccm Magensaft.

8. II. 1922. 30 g Fleisch + 10 g Cenovis-Hefeextrakt als Probekost. Stündlicher Sekretionsablauf: 24,1 — 22,3 — 3,5 — 0,5 ccm Magensaft.

9. II. 1922. Die Fleisch-Cenovis-Probekost gegeben. Stündlicher Sekretionsablauf: 21,5 — 12,7 — 4,0 — 1,0 ccm Magensaft.

18. II. 1922. Operation der doppelseitigen, intrathorakalen Sympathicotomie.

20. II. 1922. Die Alkoholprobekost gegeben. Halbstündlicher Sekretionsablauf: 8,8 — 4,6 — 3,8 — 2,4 — 1,3 — 1,4 — 1,1 — 1,0 — 0,2 — 0,1 ccm Magensaft.

21. II. 1922. Die Fleisch-Cenovis-Probekost gegeben. Stündlicher Sekretionsablauf: 20,0 — 12,8 — 8,6 — 2,2 — 0,0 ccm Magensaft.

22. II. 1922. Die Fleisch-Cenovis-Probekost gegeben. Halbstündlicher Sekretionsablauf: 7,4 — 9,6 — 10,0 — 2,4 — 2,0 — 1,2 — 1,0 — 0,4 — 0,0 ccm Magensaft.

23. II. 1922. Die Alkoholprobekost gegeben. Halbstündlicher Ablauf: 4,0 — 3,0 — 1,8 — 1,0 — 0,5 — 1,0 — 1,0 — 0,5 — 0,1 — 0,0 ccm Magensaft.

24. II. 1922. Die Alkoholprobekost gegeben. Halbstündlicher Sekretionsablauf 3,6 — 3,5 — 1,8 — 0,7 — 1,0 — 1,0 — 0,9 — 0,8 — 0,2 ccm Magensaft.

25. II. 1922. Die Fleischprobekost gegeben. Halbstündlicher Sekretionsablauf: 7,0 — 12,1 — 3,0 — 2,8 — 0,9 — 0,2 — 0,1 — 0,0 ccm Magensaft.

Die Ätherempfindlichkeit der Antikörper.

Von

J. Forssman.

(Aus dem pathologischen Institut der Universität Lund, Schweden.)

(Eingegangen am 8. März 1922.)

In früheren Arbeiten[1]) über die Wassermannreaktion[2]) habe ich u. a. auch die Äthereinwirkung auf diese Reaktion geprüft. Dabei habe ich gesehen, daß, wenn man die Wassermannsubstanz zusammen mit den Globulinen aus positiven Seren fällt und die Fällung in eine Salz- und Sodalösung löst, die so gelöste WaS. weder durch Ätherbehandlung noch durch Inaktivieren sich verändert, sondern die Lösung hierbei ihre frühere WaR. behält, aber *durch eine Ätherbehandlung mit nachfolgender Inaktivierung* zerstört oder wirkungslos wird. Daß es hier eben der Äther bei der Inaktivierungstemperatur ist, welcher die genannte Wirkung hat, geht daraus hervor, daß nach vollkommener Entfernung des zugefügten Äthers (z. B. durch Vakuum bei 30°) aus der Lösung vor dem Inaktivieren keine Verminderung der positiven Reaktion durch die Ätherbehandlung mit nachfolgender Inaktivierung bewirkt wird.

Um das Verschwinden der positiven Reaktion von den oben beschriebenen Lösungen zu veranlassen, brauchen nur sehr kleine Äthermengen verwendet zu werden, so kleine, daß man dieselben nicht mehr riechen kann.

Werden positive *Sera*, anstatt wassermannpositive *Lösungen*, mit Äther und nachfolgender Inaktivierung behandelt, so erhält man nicht mehr dieselben Ergebnisse in bezug auf die WaR. wie bei den Lösungen, sondern einige Sera werden dadurch stärker positiv und selbsthemmend, andere unverändert und noch andere negativ. Dieses unregelmäßige Verhalten hängt sicherlich davon ab, daß die Sera eine Menge sowohl quantitativ wie qualitativ verschiedener kolloidaler Substanzen enthalten, welche teils selbst verändert werden, teils als Schutzkolloide im Verhältnis zu der WaS. wirken können.

---

[1]) Diese Zeitschrift **121** und **124**; Comptes rend. de la Soc. de Biol. 26. X. 1921.

[2]) Die Wassermannreaktion wird unten mit WaR. und die Wassermannsubstanz mit WaS. bezeichnet.

Bekanntlich behaupten nun einige Forscher, daß die WaS. von Antikörpernatur ist, was aber von anderen entschieden bestritten wird. Könnte indessen gezeigt werden, daß solche Körper, die von allen Seiten als Antikörper anerkannt sind, dem Äther gegenüber regelmäßig in derselben Weise sich verhielten wie die WaS., so wäre damit ein Wahrscheinlichkeitsbeweis für die Antikörpernatur der WaS. gegeben, während auf der anderen Seite ein gegenteiliges Verhalten der Antikörper eine Stütze für die entgegengesetzte Auffassung wäre. Um solche Wahrscheinlichkeitsbeweise liefern zu können, sind die untenstehenden Versuche ausgeführt worden.

Hierzu sind sowohl normale wie immunisatorisch erzeugte Antikörper benutzt worden. Als Normalantikörper habe ich das Normalhämolysin des Menschenserums Hammelblutkörperchen gegenüber und das Normalagglutinin des Ochsenserums Meerschweinchenblutkörperchen gegenüber gewählt; als Immunantikörper teils mit Hammelblut oder Meerschweinchennieren bei Kaninchen erzeugte Hammelhämolysine teils Immunagglutinine von Kaninchen gegen Typhus.

Wie bei meinen Wassermannuntersuchungen sind nicht nur die Sera, sondern auch, und das ist eben die Hauptsache, die aus den Seren ausgefällten und demnach von der Hauptmenge der übrigen Serumbestandteile befreiten und dann in eine 0,8proz. Salz- und 0,1proz. Sodalösung (unten kurzwegs nur als Salz- und Sodalösung bezeichnet) gelösten Antikörper in ihrem Verhältnis zueinander untersucht worden.

Bei der Ausfällung der Antikörper aus den Seren ist, wenn nicht anders besonders gesagt wird, Essigsäure und destilliertes Wasser benutzt worden, ganz so wie bei der Ausfällung der WaS. in meinen schon erwähnten Wa.-Arbeiten. Nimmt man hier wie da nur 0,08 ccm 2proz. Essigsäure und 10 ccm destilliertes Wasser pro ccm Serum, wodurch immer eine ganz gute Fällung in Menschenserum bewirkt wird, so bekommt man, sobald man mit Kaninchenserum arbeitet, nur ausnahmsweise eine absehbare, mitunter sogar keine Fällung, was auch *F. Gloor* und *Klinger*[1]) unter Anwendung von $^{n}/_{300}$-HCl gesehen haben. Setzt man dann mehr Wasser zu z. B. 20—100 ccm pro ccm Serum, so wird die Fällung entschieden besser, obgleich immer klein. Der Gehalt einer solchen Fällung an Antikörpern wechselt bei verschiedenen Seren deutlich, beträgt aber in den besten Fällen nur $^{1}/_{3}$ der gesamten Antikörpermenge des Serums.

Da indessen, wie gesagt, die Fällung mit Essigsäure und destilliertem Wasser in Menschenseren viel stärker ist als in Kaninchenseren und da höchstwahrscheinlich die Antikörper dadurch in diese Fällungen übergehen, daß sie von den Euglobulinen mitgerissen werden, so bin ich, um ein besseres Fällungsresultat betreffs der Antikörper zu bekommen, auch in der Weise vorgegangen, daß ich 0,1 ccm des antikörperhaltigen Kaninchenserums mit 0,9 ccm Menschenserum mischte, und diese Mischung in gewöhnlicher Weise fällte. Dadurch bekam ich im allgemeinen tatsächlich auch prozentuell mehr von Kaninchenantikörpern in der Fällung.

Außerdem ist auch Ammoniumsulfat als Fällungsmittel für die Antikörper angewandt worden. Näheres darüber unten.

---

[1]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie **29**.

Bei der Ätherbehandlung bin ich hauptsächlich so verfahren wie bei der entsprechenden Behandlung von wassermannpositiven Seren oder von wassermannpositiven Lösungen bei meinen zitierten Untersuchungen. Die antikörperhaltigen *Sera* sind indessen nur mit 0,1 ccm Äther zu 1 ccm Serum versetzt und dann inaktiviert; die antikörperhaltigen *Lösungen* dagegen außerdem teils so, daß zu 1 ccm Lösung 10 ccm Äther zugefügt und nach 1 Stunde weggegossen wurden; dann Inaktivierung; teils auch so wie eben gesagt, nur mit dem Unterschied, daß vor dem Inaktivieren die letzten Spuren von Äther durch Vakuum bei 30° entfernt wurden.

In denjenigen ätherbehandelten Proben, wo der Äther nicht durch Vakuum vollkommen entfernt worden ist, bleibt möglicherweise trotz der Inaktivierung ein wenig Äther zurück. Wenn man aber bedenkt, daß in 1 ccm der ätherbehandelten Flüssigkeit unmittelbar vor dem Inaktivieren höchstens 0,1 ccm Äther zurückbleibt, daß dieser Äther beim Inaktivieren sicherlich zum allergrößten Teil, wahrscheinlich sogar vollkommen, verdampft und daß endlich von der so behandelten Portion niemals mehr als 0,2 ccm genommen wird, um eine Hämolysin- oder Agglutininprobe anzustellen, so ist es auch damit einleuchtend, daß die hierbei möglicherweise zurückbleibende Äthermenge viel zu klein ist, um diese Reaktionen zu beeinflussen.

Normalhämolysine.

18 Menschensera wurden auf ihren Hammelhämolysingehalt austitriert. Das stärkste dieser Sera hämolysierte 1 ccm 5proz. Hammelblut in einer Dosis von 0,02 ccm zusammen mit 0,1 ccm Meerschweinchenkomplement. Beim Inaktivieren ging dieser Titer bis 0,05 ccm herunter. Wurde nun zu 1 ccm eines solchen Serums in *aktivem* Zustande 0,1 ccm Äther zugesetzt und sodann inaktiviert, so vermochte das Serum Hammelblutkörperchen nicht mehr aufzulösen. (Der Ätherzusatz ohne folgende Inaktivierung beeinflußte nicht das Hämolysinvermögen des Serums.) *Daß diese durch die Ätherbehandlung mit nachfolgender Inaktivierung bewirkte Veränderung des Serums, eine Veränderung, die vollkommen konstant ist, vom Verschwinden des Amboceptors abhängt* und nicht von Beschädigung des zugefügten Komplementes durch das ätherbehandelte Serum hervorgerufen wird, *geht deutlich daraus hervor, daß nach Beimischen einer kleinen Menge Amboceptor zu einer solchen Probe Hämolyse eintritt.*

Wird das Hämolysin zusammen mit den Globulinen aus einem aktiven Menschenserum mit Essigsäure und destilliertem Wasser gefällt, die Fällung in eine der ursprünglichen Serummenge entsprechende Menge von Salz- und Sodalösung gelöst und 1 ccm dieser Lösung mit 10 ccm Äther versetzt, der Äther nach 1 Stunde abgegossen und die Lösung dann inaktiviert, so verschwindet auch in diesem Falle das Hämolysin (der Amboceptor) aus der Lösung, während eine Ätherbehandlung ohne

nachfolgende Inaktivierung oder eine einfache Inaktivierung ohne vorausgehende Ätherbehandlung keine Veränderung des Hämolysingehalts mit sich führt.

Dieselbe vernichtende Wirkung der Ätherbehandlung sieht man, wie oben beschrieben, auch, wenn nur 0,1 ccm Äther pro Kubikzentimeter Lösung unmittelbar vor dem Inaktivieren zugesetzt wird.

Hieraus ist also ersichtlich, daß *das hier untersuchte Normalhämolysin sich Äther gegenüber bei nachfolgender Inaktivierung genau so verhält wie die WaS.*

Normalagglutinine.

Bei derselben Behandlung von Normalagglutininen der Ochsensera Meerschweinchenblutkörperchen gegenüber erwies es sich, daß diese Normalantikörper, einerlei ob sie in den Seren vorkamen oder aus diesen ausgefällt und in Salz- und Sodalösung gelöst waren, gar nicht beeinflußt wurden; *also verhielten diese Normalagglutinine sich nicht wie die WaS.*

Immunhämolysine.

7 gegen Hammelblut immunhämolytische Kaninchensera wurden auf ihre Ätherempfindlichkeit geprüft; davon waren 5 durch Hammelblutinjektionen, 2 durch Meerschweinchenniereninjektionen erzeugt. Da es möglich erschien, daß frisch bereitete und alte (vor langer Zeit genommene) Sera sich verschieden verhalten könnten, so benutzte ich 2 alte und 3 ganz frische Sera der ersten Kategorie, der homologen Sera, und ein altes und ein neues Serum der zweiten, der heterogenetischen.

Schon bei der einfachen Inaktivierung verhielten sich diese Sera verschieden. Die alten homologen Sera wurden dadurch nicht abgeschwächt, das alte heterogenetische dagegen in dem Grade, daß sein Titer von 0,003 bis 0,007 ccm herunterging. Von den frischen Seren wurden die 2 homologen erheblich, das dritte homologe und das heterogenetische gar nicht abgeschwächt.

Setzte ich nun 0,1 ccm Äther zu 1 ccm jedes dieser Sera und inaktivierte, so veränderten sich auch dadurch weder die alten homologen noch das frische heterogenetische, während der Hämolysingehalt der anderen bedeutend herunterging. Als Beispiel kann ich das Serum 1061 anführen. Es hämolysierte im frischen Zustande in Dosis von 0,00004, inaktiviert in Dosis von 0,00008 und mit Äther inaktiviert nur in Dosis von 0,0003 ccm.

Bei dieser Ätherbehandlung der hämolytischen Sera erhält man also sehr wechselnde Resultate, ganz so wie es bei entsprechender Behandlung von wassermannpositiven Seren mit der WaR der Fall ist. Diese Variationen hängen wahrscheinlich hier wie da mit dem verschiedenen Gehalt der Sera an Kolloiden, welche als Schutzkolloide wirken, zusammen.

Sobald man aber mit ausgefällten und in Salz- und Sodalösung gelösten Immunhämolysinen arbeitet, ändern sich die Ergebnisse der Ätherbehandlung. Ich gebe hier einige Tabellen, welche dies veranschaulichen.

Tabelle I.

5 ccm jedes der homologen hammelhämolytischen Kaninchensera 1062, 1061 und 1059 wurden mit 0,08 ccm 2proz. Essigsäure und 20 ccm destilliertem Wasser pro ccm Serum gefällt, zentrifugiert, und jeder Bodensatz in je 5 ccm Salz- und Sodalösung gelöst. Diese Lösungen wurden in bezug auf ihren Amboceptorgehalt zusammen mit Meerschweinchenserum als Komplement (0,1 ccm für jedes Röhrchen) austitriert. ×××× bezeichnet hier und überall unten komplette, ××× fast komplette, ×× starke, × Spur und 0 keine Hämolyse.

		0,005 ccm	0,0015 ccm	0,0005 ccm	0,00025 ccm	0,00015 ccm
1. Serum 1062		××××	××××	××××	××××	×××
2. Bodensatzlösung		××××	××××	0	0	0
3. „	Inaktivierung	××××	××××	0	0	0
4. 1 ccm Bodensatzlösung 10 ccm Äther zugesetzt, nach 1 Std. abgegossen	Inaktivierung	0	0	0	0	0
5. ganz wie 4., nur daß die letzten Ätherspur. durch Vakuum bei 30° entfernt wurden	Inaktivierung	××××	××××	0	0	0
6. 1 ccm Bodensatzlösung + 0,1 ccm Äther	Inaktivierung	××××	0	0	0	0

		0,0005 ccm	0,00025 ccm	0,00005 ccm	0,000025 ccm	0,000015 ccm
7. Serum 1061		××××	××××	××××	××××	×××
8. Bodensatzlösung		××××	××××	××××	0	0
9. „	Inaktivierung	××××	××××	×	0	0
10. 1 ccm Bodensatzlösung, behandelt wie 4	Inaktivierung	0	0	0	0	0
11. 1 ccm Bodensatzlösung, behandelt wie 5	Inaktivierung	××××	××××	×××	0	0
12. 1 ccm Bodensatzlösung, behandelt wie 6	Inaktivierung	0	0	0	0	0

		0,03 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm	0,003 ccm	0,001 ccm	0,0093 ccm
13. Serum 1059		××××	××××	××××	××××	××××	××××
14. Bodensatzlösung		××××	××××	××××	××××	××××	××
15. „	Inaktivierung	××××	××××	××××	××××	××××	0
16. 1 ccm Bodensatzlösung, behandelt wie 4	Inaktivierung	××××	××××	××	0	0	0
17. Eine Bodensatzlösung, behandelt wie 5	Inaktivierung	××××	××××	××××	××××	××××	0
18. 1 ccm Bodensatzlösung, behandelt wie 6	Inaktivierung	××××	××××	××××	××××	0	0

Tabelle II.

0,7 ccm des Serums 1061 wurde zu 7 ccm Menschenserum gesetzt. 5 ccm dieser Mischung wurden mit 0,08 ccm 2% Essigsäure und 10 ccm destilliertem Wasser pro ccm Serum gefällt; Zentrifugierung; der Bodensatz in 5 ccm Salz- und Sodalösung gelöst. Austitrierung wie in Tabelle I.

		0,01 ccm	0,005 ccm	0,003 ccm	0,001 ccm	0,0005 ccm
1. Die Serummischung		× × × ×	× × × ×	× × × ×	× × × ×	× ×
2. „ „ Inaktivier.,		× × × ×	× × × ×	× × × ×	× × × ×	× ×
3. Bodensatzlösung		× × × ×	× × × ×	× × × ×	×	0
4. „	Inaktivierung	× × × ×	× × × ×	× × × ×	0	0
5. 1 ccm Bodensatzlösung, 10 ccm Äther zugesetzt, nach 1 Std. abgegossen	Inaktivierung	0	0	0	0	0
6. wie 5., nur daß die letzten Ätherspuren durch Vakuum bei 30° entfernt wurden	Inaktivierung	× × × ×	× × × ×	× × × ×	0	0
7. 1 ccm Bodensatzlösung + 0,1 ccm Äther	Inaktivierung	0	0	0	0	0

Tabelle III.

Drei Portionen, jede 2 ccm Menschenserum enthaltend, wurden mit je 0,2 ccm Serum 1061 versetzt. Die erste Portion wurde mit 1 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, die zweite mit 1,40 ccm und die dritte mit 2 ccm gefällt. Zentrifugierung. Die Bodensätze wurden je in 2 ccm Salz- und Sodalösung gelöst. Diese Lösungen, die wie in den vorigen Tabellen betreffs ihres Amboceptorgehalts austitriert wurden, werden unten in oben angegebener Ordnung mit 1., 2., 3. bezeichnet.

		0,01 ccm	0,005 ccm	0,003 ccm	0,001 ccm	0,0005 ccm	0,0003 ccm
1. a) Die Lösung		× × × ×	× × × ×	×	0	0	0
b) „ „	Inaktivier.	× × × ×	× × × ×	0	0	0	0
c) 0,5 ccm der Lösung, 5 ccm Äther zugesetzt, nach 1 Std. abgegossen	Inaktivier.	× × × ×	×	0	0	0	0
d) 0,5 ccm der Lösung + 0,1 ccm Äther	Inaktivier.	× × × ×	× × × ×	0	0	0	0
2. a) Die Lösung		× × × ×	× × × ×	× × × ×	× ×	0	0
b) „ „	Inaktivier.	× × × ×	× × × ×	× × × ×	× ×	0	0
c) 0,5 ccm der Lösung, wie bei 1. c) behandelt	Inaktivier.	× × × ×	× × × ×	× × × ×	0	0	0
d) 0,5 ccm der Lösung + 0,1 ccm Äther	Inaktivier.	× × × ×	× × × ×	× × × ×	× ×	0	0
3. a) Die Lösung		× × × ×	× × × ×	× × × ×	× ×	0	0
b) „ „	Inaktivier.	× × × ×	× × × ×	× × × ×	× ×	0	0
c) 0,5 ccm der Lösung, wie bei 1. c) behandelt	Inaktivier.	× × × ×	× × × ×	× × × ×	×	0	0
d) 0,5 ccm der Lösung + 0,1 ccm Äther	Inaktivier.	× × × ×	× × × ×	× × × ×	× ×	0	0
4. Die ursprüngliche Serummischung		× × × ×	× × × ×	× × × ×	× × × ×	× × × ×	× × ×

Nebst den in den vorstehenden Tabellen vorkommenden Seren sind 2 andere homologe und 2 heterogenetische hammelhämolytische Kaninchensera in derselben Weise untersucht worden. Prinzipiell haben sie alle dieselben Ergebnisse gegeben, weshalb ich auch darauf verzichten kann, die übrigen Versuchsprotokolle hier wiederzugeben. Die Verschiedenheiten waren nur quantitativer Natur und äußerten sich dadurch, daß, wie schon oben erwähnt worden ist, die Fällungsresultate bei den verschiedenen Serien nicht gleich stark waren und daß die Folgen der Ätherbehandlung bei den verschiedenen Bodensätzen auch quantitative Variationen aufwiesen, und dies sogar betreffs Bodensätze, welche aus demselben Serum stammten, wie aus einem Vergleich zwischen den Resultaten der Ätherbehandlung von Bodensätzen des Serums 1059 bei zwei verschiedenen Gelegenheiten (Tabelle I, 13—18 und die unten folgende Tabelle IV, 1—3), wo in Tabelle I 0,1 ccm Äther pro Kubikzentimeter Bodensatzlösung mit Inaktivierung (18) den Titer von 0,001—0,003 ccm herunterbrachte, während in Tabelle IV die gleiche Behandlung keine merkbare Einwirkung hatte (3) und nur eine intensivere Ätherbehandlung (4, 5) eine Verminderung des Hämolysingehalts mit sich führte. Eine solche Resistenz der Hämolysine gegen die Ätherbehandlung wie in Tabelle IV ist doch sehr selten; die Verhältnisse in den Tabellen I und II sind die im allgemeinen vorkommenden.

Aus diesen Tabellen ist nun folgendes ersichtlich: *Erstens*, daß die Immunhämolysine ebenso wie die Normalhämolysine durch die Ätherbehandlung mit nachfolgender Inaktivierung zerstört bzw. bedeutend abgeschwächt werden. Dies stimmt ja vollkommen mit dem, was wir bei der WaS. sehen. Daß die Ätherwirkung nicht in allen Fällen von derselben Stärke ist, wie schon oben gesagt ist, sondern daß in einigen Versuchen hierdurch die Hämolysine mehr (Tabelle I, 4, 10; Tabelle II, 5) in anderen weniger (Tabelle I, 16) oder wie in Tabelle IV nur schwer reduziert werden, ist ja auch der Fall mit der WaS. und hängt wahrscheinlich hier wie da mit dem Vorkommen von ungleichen Mengen Schutzkolloiden in den verschiedenen Lösungen zusammen. Dies wird auch dadurch wahrscheinlich, daß, wenn man mit verschiedenen Quantitäten Ammoniumsulfat fällt, wie in den Versuchen der Tabelle III[1]), und dadurch verschiedene Fällungen erhält, die Ätherwirkung fast nur da hervortritt, wo die kleinste, am wenigsten globulinreiche Fällung vorkommt, und selbst in diesem Falle ist die Wirkung viel weniger hervortretend als bei den Fällen mit Essigsäure und destilliertem Wasser. *Zweitens* sieht man, daß der Hämolysingehalt überall da unverändert ist, wo die letzten Ätherspuren vor dem Inaktivieren vollkommen entfernt

[1]) Daß die Am_2SO_4-Mengen, welche bei den Versuchen in Tab. III vorkamen, weder selbst Hämolyse hervorriefen noch die Hämolyse beeinflußten, wurde durch besondere Kontrollversuche festgestellt.

worden sind, was also beweist, daß das Verschwinden bzw. das Heruntergehen des Hämolysins bei der Ätherbehandlung eben die Folge von der Äthereinwirkung bei Inaktivierungstemperatur ist. Oft erhält man infolgedessen auch dieselbe Wirkung, wenn zu 1 ccm Lösung 10 ccm Äther, welcher nach 1 Stunde vor dem Inaktivieren abgegossen wird, oder wenn nur 0,1 ccm Äther kurz vor dem Inaktivieren zugesetzt wird. Im allgemeinen findet man doch, daß das erstgenannte Vorgehen stärker wirkt (vgl. z. B. Tabelle I, 5 u. 6). Wahrscheinlich beruht das darauf, daß mit größerer Äthermenge und längerer Berührung zwischen dem Äther und der Bodensatzlösung mehr Äther in dieser sich löst, als wenn nur unmittelbar vor dem Inaktivieren 0,1 ccm zugefügt wird. Wie ersichtlich stimmen also die Hämolysine in allen diesen Beziehungen mit der WaS. überein.

Das eben besprochene Verhältnis, daß im allgemeinen eine größere Ätherquantität, die zudem längere Zeit mit der Bodensatzlösung in Berührung gestanden hat, auf die Hämolysine stärker einwirkt als eine kleinere, kurz vor dem Inaktivieren zugesetzte Äthermenge, veranlaßt die Frage, in welcher Beziehung steht die benutzte Äthermenge zur Menge von zerstörtem Hämolysin?

Alle hier schon mitgeteilten Ätherbehandlungen sind in offenen Röhrchen gemacht. Bei Inaktivierungstemperatur entweicht dabei der obenstehende Äther schnell und nur der in den Bodensatzlösungen schon gelöste Äther wirkt weiter. Die gelöste Äthermenge, welche hierbei in Frage kommt, ist offenbar sehr klein und geht kaum merklich zu erhöhen. Wird dagegen in zugeschlossenen Gefäßen inaktiviert, so kann der Äther nicht entweichen, sondern die unter Druck stehenden Ätherdämpfe müssen während der ganzen Inaktivierungszeit auf die Bodensatzlösungen einwirken, sich immer wieder hier lösen und evtl. neue Hämolysinmengen zerlegen.

Durch eine solche Versuchsanordnung kann man konstante Hämolysinmengen gegen variable Äthermengen und variable Hämolysinmengen gegen konstante Äthermengen prüfen, um zu sehen. ob bestimmte Äthermengen immer dieselben Hämolysinmengen wirkungslos machen. Dies habe ich nun in folgender Weise gemacht.

5 ccm des Serums 1059 wurden mit 0,08 ccm Essigsäure und 100 ccm destilliertem Wasser pro Kubikzentimeter Serum gefällt, zentrifugiert und der Bodensatz in 5 ccm Salz- und Sodalösung gelöst. Hiervon wurden nun diejenigen in der untenstehenden Tabelle IV angegebenen Mengen mit soviel Salz- und Sodalösung versetzt, daß jede Probe genau 2 ccm enthielt. Die Gefäße, welche für das Inaktivieren benutzt wurden, hatten gut eingeschliffene Glasstöpsel, die außerdem während der Inaktivierung sorgfältig angebunden waren, und alle hatten ungefähr dasselbe Volumen, nämlich 40 ccm. Weiteres geht aus der Tabelle hervor.

Tabelle IV.

Bodensatzlösung ist unten mit Bd. und die in dieser Arbeit überall benutzte Salz- und Sodalösung mit SS bezeichnet.

1. 0,2 ccm Bd. + 1,8 ccm SS
2. 0,2 ccm Bd. + 1,8 ccm SS inaktiviert
3. 0,2 ccm Bd. + 1,8 ccm SS + 0,2 ccm Äther, in offenem Röhrchen inaktiviert.
4. 0,2 ccm Bd. + 1,8 ccm SS + 0,2 ccm Äther, in geschlossenem Gefäße inaktiviert.
5. 0,2 ccm Bd. + 1,8 ccm SS + 2 ccm Äther, in geschlossenem Gefäße inaktiviert.
6. 0,4 ccm Bd. + 1,6 ccm SS + 0,2 ccm Äther, in offenem Röhrchen inaktiviert.
7. 0,4 ccm Bd. + 1,6 ccm SS + 0,2 ccm Äther, in geschlossenem Gefäße inaktiviert.
8. 0,4 ccm Bd. + 1,6 ccm SS + 2 ccm Äther, in geschlossenem Gefäße inaktiviert.
9. 0,8 ccm Bd. + 1,2 ccm SS + 0,2 ccm Äther, in offenem Röhrchen inaktiviert.
10. 0,8 ccm Bd. + 1,2 ccm SS + 0,2 ccm Äther, in geschlossenem Gefäße inaktiviert.
11. 0,8 ccm Bd. + 1,2 ccm SS + 2 ccm Äther, in geschlossenem Gefäße inaktiviert.

Nachdem den Proben 6 bis 11 soviel SS zugesetzt worden war, daß die Bd. hier in ganz derselben Verdünnung vorkam wie in den Proben 1 bis 5, d. h. 2 ccm SS zu den Proben 6 bis 8 und 6 ccm SS zu 9 bis 11, wurden alle Proben betreffs ihres Hämolysingehaltes mit folgendem Resultate austitriert.

	0,3 ccm	0,1 ccm	0,05 ccm	0,03 ccm	0,02 ccm	0,01 ccm	0,005 ccm
1.	××××	××××	××××	××××	××××	××××	××
2.	××××	××××	××××	××××	××××	××××	0
3.	××××	××××	××××	××××	××××	××××	0
4.	××××	××××	××××	××××	××××	××	0
5.	××××	××××	0	0	0	0	0
6.	××××	××××	××××	××××	××××	××××	0
7.	××××	××××	××××	××××	××××	××××	0
8.	××××	××××	××××	××××	×	0	0
9.	××××	××××	××××	××××	××××	××××	0
10.	××××	××××	××××	××××	××××	××××	0
11.	××××	××××	××××	××××	×	0	0

Beim Vergleich zwischen 1. und 2. findet man, daß die einfache Inaktivierung die Lösung ein wenig abschwächt. Dagegen übt, in Gegensatz zu dem, was wir bei den anderen Bodensatzlösungen gesehen haben, die Ätherbehandlung mit folgender Inaktivierung unter den bisher gewöhnlich eingehaltenen Versuchsbedingungen (3), d. h. in offenen Röhrchen, keinen größeren Einfluß als die Inaktivierung selbst aus (2). Inaktivierung in geschlossenen Röhrchen (4, 5), vor allem unter Verwendung einer größeren Menge Äther führt dagegen ein Verschwinden der Hämolysine mit sich.

Der Tabelle IV gemäß enthielt $^1/_{10}$ ccm der unverdünnten Bodensatzlösung 100 hämolytische Dosen. In jedem Röhrchen 9—11 war 0,8 ccm Bodensatzlösung, also 800 hämolytische Dosen. Nach der Behandlung und Inaktivierung mit 2 ccm Äther (11) wurden diese, wie die folgende Berechnung zeigt, erheblich reduziert. Der Inhalt jedes dieser Röhrchen betrug ja 2 ccm und nachdem derselbe mit 6 ccm Salz- und Sodalösung

aufgefüllt war, wodurch auf jeden Kubikzentimeter 0,1 ccm der ursprünglichen Bodensatzlösung kam, wurde der Hämolysingehalt austitriert und für 9 und 10 pro Kubikzentimeter gleich 100 gefunden, während die entsprechenden Werte für 11 33 waren. Reduktion demnach 8 • 67 oder 536 hämolytische Dosen, was 66% beträgt.

Betrachtet man dann die Röhrchen 6—8, welche im Vergleich mit den Röhrchen 9—11 nur die Hälfte der unverdünnten Bodensatzlösung enthielten, und berechnet man in derselben Weise die Reduktion, die hier durch Behandlung und Inaktivierung mit 2 ccm Äther erzeugt worden ist, so sieht man, daß von 400 Dosen 267 zerstört worden sind, also allerdings dieselbe prozentuelle Zerstörung, aber absolut genommen weit weniger als bei der erstgenannten Kategorie.

In den Röhrchen 3—5 wurden nach derselben Behandlung von 200 hämolytischen Dosen 180 zerstört, was 90% der Gesamtmenge ausmacht, aber eine noch kleinere absolute Hämolysinquantität ist, als sogar bei der zweiten Kategorie (6—8).

Es ist also ersichtlich, daß dieselbe Äthermenge gar nicht dieselbe Hämolysinmenge zerstört.

In 11 wurden also 536, in 8 267 und in 5 nur 180 hämolytische Dosen von der gleichen Quantität unwirksam gemacht. Dies Ergebnis läßt sich kaum mit der Auffassung vereinigen, daß es sich hier um einen stereochemischen Prozeß zwischen dem Äther und dem Hämolysin handelt, sondern man muß vielmehr annehmen, daß ein Adsorptionsprozeß vorliegt. Hierfür spricht noch folgender Befund. Bei dem homologen hammelhämolytischen Kaninchenserum 1089 sah ich nämlich, daß der aus dem Serum direkt mit Essigsäure und destilliertem Wasser ausgefällte Bodensatz, in Salz- und Sodalösung wie gewöhnlich gelöst, außerordentlich wenig betreffs seines Hämolysingehalts durch die Ätherbehandlung mit folgender Inaktivierung verändert wurde, während dasselbe Serum, mit Menschenserum im Verhältnis 1 : 9 gemischt nach Fällen wie oben mit Essigsäure und destilliertem Wasser einen Bodensatz gab, der sein hämolytisches Vermögen durch dieselbe Ätherbehandlung und Inaktivierung fast vollkommen einbüßte. Auch zeigte sich die schon in Tabelle III aufgewiesene Tatsache, daß nach Fällen mit größerer Menge Am_2SO_4 Bodensätze erhalten werden, die fast gar nicht von der Ätherbehandlung mit Inaktivierung beeinflußt werden, während Bodensätze aus demselben Serum aber mit kleinerer Menge Am_2SO_4 erhalten, sich für dieselbe Behandlung sehr empfindlich erweisen. Daß auch durch Fällen mit Essigsäure und destilliertem Wasser von demselben Serum bei verschiedenen Gelegenheiten Bodensätze erhalten werden, die sich dieser Behandlung gegenüber ungleich verhalten, weist in dieselbe Richtung hin.

Immunagglutinine.

Betreffs der Immunagglutinine kann ich mich sehr kurz fassen. Gleichgültig ob diese in Seren gelöst oder vorher ausgefällt und dann in Salz- und Sodalösung gelöst liegen, sind sie der Ätherbehandlung mit Inaktivierung gegenüber vollkommen oder fast vollkommen resistent. Dies war bei allen hierauf untersuchten hoch- wie schwachagglutinierenden Typhusseren der Fall, eines ausgenommen. Hier bekam ich nämlich ganz unregelmäßige Ergebnisse sobald ich Bodensätze, welche direkt aus dem Serum mit Essigsäure und destilliertem Wasser ausgefällt waren, behandelte, aber wenn ich das Serum mit Menschenserum vermischte und dann fällte, erwiesen sich auch diese Agglutinine der Behandlung gegenüber resistent.

Die Hämolysine und die Agglutinine verhalten sich also bei dieser Ätherreaktion verschieden. Selbst wenn diese Antikörper zusammen in einem und demselben Serum sich befinden, ist dies der Fall, wovon ich mich dadurch überzeugte, daß ich ein Kaninchen gleichzeitig mit Hammelblut und Typhusbacillen immunisierte und dann die beiden Antikörperarten, in demselben Bodensatz ausgefällt und zusammen gelöst, behandelte.

Meine Hoffnung, in dieser Ätherreaktion einen Wahrscheinlichkeitsbeweis für oder gegen die Auffassung der WaS. als einen Antikörper zu finden, ist, da die anerkannten Antikörper hierbei nicht einheitlich reagieren, also nicht erfüllt worden.

Zusammenfassung.

1. Die WaS., aus positiven Seren ausgefällt und in Salz- und Sodalösung gelöst, wird durch Ätherbehandlung mit nachfolgender Inaktivierung zerstört.

2. Die Normalhammelhämolysine der Menschensera, gleichviel ob sie in den Seren oder aus diesen ausgefällt und in Salz- und Sodalösung gelöst vorkommen, verhalten sich derselben Behandlung gegenüber ganz wie die WaS.

3. Dasselbe ist auch der Fall mit den Immunhammelhämolysinen der Kaninchensera, vorausgesetzt, daß sie in Salz- und Soda gelöst werden.

4. Die Agglutinine — sowohl die Normalagglutinine gegen Meerschweinchenblutkörper in Ochsenserum als auch die Typhusimmunagglutinine des Kaninchenserums — reagieren gar nicht oder, wenn überhaupt, kaum merklich für die genannte Ätherbehandlung.

5. Diese Ätherreaktion ist nicht als eine stereochemische, sondern als eine Adsorptionsreaktion aufzufassen.

6. Da verschiedene Antikörper — Hämolysine und Agglutinine — sich der Reaktion gegenüber verschieden verhalten, liefern sie keinen Beweis betreffs der Natur der WaS., ob sie einen Antikörper darstellt oder nicht.

Das gegenseitige Mengenverhältnis der Kohlenhydrate im Laubblatt in seiner Abhängigkeit vom Wassergehalt.

Vorläufige Mitteilung.

Von

H. Schroeder und **Trude Horn.**

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Kiel.)

(Eingegangen am 9. März 1922.)

In dem Ende Dezember ausgegebenen Hefte der Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft erschien eine kurze Abhandlung von *Molisch* „Über den Einfluß der Transpiration auf das Verschwinden der Stärke in den Blättern“[1]), die uns zur nachstehenden, vorläufigen Mitteilung veranlaßt. Eine ausführliche Beschreibung der bisherigen Versuche wird die Dissertation von Frl. *Horn* bringen; ferner werden die Ergebnisse seinerzeit zusammen mit anderen das Assimilationsproblem betreffenden Arbeiten aus dem hiesigen Institut veröffentlicht werden. Ein Abschluß ist bis jetzt nicht erreicht, und es besteht die Absicht, sowohl die hier besprochenen als auch eine größere Anzahl anschließender Fragen weiter zu behandeln. Der eine von uns hat bei der Tagung der Deutschen botanischen Gesellschaft in München am 9. VIII. vorigen Jahres die wesentlichsten Ergebnisse vorgetragen, allerdings, da die ihm zugemessene Zeit durch den Bericht über andere hier nicht zu besprechende Untersuchungen erschöpft war, nur mit wenigen Worten. Diese gipfelten darin, daß das gegenseitige Mengenverhältnis der Kohlenhydrate im Laubblatt[2]) unter anderem abhängig sei von dem Wassergehalt.

Zur Begründung dieses Satzes, der ein in nicht wenigen Punkten noch sicherzustellendes Ergebnis und ein Programm bedeutet, können wir heute die folgenden Tatsachen und Erwägungen vorbringen.

---

[1]) *Molisch*, Ber. d. Dtsch. botan. Ges. **39**, 339. 1921.

[2]) Und wohl auch in anderen Pflanzenorganen, unter Ausschluß der Reservestoffbehälter.

I. Der Stärkegehalt.

Im Sommer 1920 begann Frl. *Horn* auf Veranlassung von *Schroeder* eine Untersuchung des von *Ursprung* beschriebenen und von ihm Solarisation genannten Phänomens[1]). In orientierenden Vorversuchen erkannte sie bald, daß bei voller Besonnung der abgeschnittenen Blätter (Syringa vulgaris) die Stärke verschwand, wenn ein Anwelken eintrat, daß hingegen in turgescenten Blättern Stärke nach wie vor vorhanden war. Es stand offenbar das Verschwinden der Stärke in Beziehung zu dem Wasserverlust oder dem Wassergehalt. Diese Erkenntnis veranlaßte uns, das Studium der Solarisation aufzugeben[2]) und die Beziehung des Stärkegehaltes oder des Kohlenhydratgehaltes überhaupt, denn es bestand gleich die Absicht, die Zucker einzubeziehen, zum Wassergehalt zu untersuchen. Wir wählten Blätter von Tropäolum majus als erstes Versuchsobjekt, weil diese bekanntlich für die Jodprobe nach *Sachs* besonders geeignet sind, mehr noch darum, weil ihr Kohlenhydratumsatz von *Brown* und *Morris* und von *Gast*[3]) untersucht worden ist, so daß ein Anknüpfen an gegebene Resultate zu erwarten war.

Es konnte leicht festgestellt werden, daß die Stärke beim Welken verschwindet, wie das die nachstehenden Belegversuche zeigen. Diese wurden, wie alle im folgenden aufgeführten Versuche bei Lichtabschluß (Dunkelzimmer) angestellt.

Versuch 1[4]) (25. VI. 1920): 4 Blätter von Tropaeolum majus (2 benachbarte Paare) wurden längs eines median gelegenen Nerven halbiert. Jeweils die eine, stiellose Hälfte wurde als Kontrolle sofort in Alkohol gelegt, während die andere, Versuchshälfte, 26 Stunden lang der in der Tabelle angegebenen Behandlung ausgesetzt wurde. Nach Abschluß des Versuches wurden die beiden Hälften eines jeden Blattes nebeneinander der Jodprobe, nach *Sachs*, unterworfen.

Behandlung der Versuchshälften	Stärkegehalt der Versuchshälften	Stärkegehalt der Kontrollhälften
Trocken. In offener Glasschale an Luft.	reichlich	etwas mehr als die Versuchshälfte
Sehr trocken. In Exsiccator über Chlorcalcium.	keine	viel
Feucht. Mit der Spreitenunterseite auf Wasser schwimmend, die Stiele eintauchend	viel	viel

[1]) *Ursprung*, Botan. Ber. **35**, 57. 1917.

[2]) Wir sind daher heute nicht in der Lage anzugeben, ob das Solarisationsphänomen mit unseren im folgenden mitgeteilten Befunden irgendwie zusammenhänge.

[3]) *Brown* und *Morris*, Journ. of the Chem. Soc. (London) **63**, 604. 1893. — *Gast*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **99**, 1. 1916. — *Brown* und *Morris* (l. c. S. 662) konnten außer Rohrzucker, Maltose, Glucose und Fructose keinen Zucker im alkoholigen Extrakt dieser Blätter finden, auch keine Pentosen oder Stoffe, die bei der Hydrolyse Pentosen liefern.

[4]) Zwecks Verweisungen sind die Versuche ohne Rücksicht auf zeitliche Folge durchlaufend numeriert.

Ebenso verliefen einige weitere Versuche mit der gleichen Pflanze. Ihre Mitteilung erübrigt, da die im nächsten Abschnitt (Zuckergehalt) aufgeführten Tabellen in der letzten Spalte Angaben über den Ausfall der Jodprobe enthalten, die durchweg das vorstehende Resultat bestätigen.

Versuch 2 (22. IV. 1921): 4 Blättchen von *Mnium cuspidatum* halbiert. Von jedem wurde die eine Hälfte in einer bedeckten Petrischale auf nasses Filtrierpapier gelegt, die andere auf einen trockenen Objektträger in einer feuchten Kammer, gebildet durch eine geschlossene Petrischale, deren Boden mit angefeuchtetem Filtrierpapier ausgekleidet war. Nach 18 Stunden enthielten die ersteren, turgescenten Hälften viel (eine: mäßig viel) Stärke, während die auf den trockenen Objektträger gelegten, die gewelkt waren, sich sämtlich als stärkefrei erwiesen[1]), und so in einigen weiteren Versuchen.

Die etwas umständliche Behandlung der zum Welken bestimmten Blatthälften war notwendig, weil bei allzu raschem Austrocknen der Moosblättchen der Stärkeschwund unterblieb.

Versuch 3 (22. IV. 1921): 4 Blättchen von *Mnium cuspidatum* halbiert. Die feucht gehaltenen Hälften wie in Versuch 2 auf nassem Filtrierpapier in Petrischale, die anderen diesmal auf nicht angefeuchtetem Papier in trockener Schale. Nach 18 Stunden enthielten die ersteren, sie waren wiederum turgescent geblieben, reichlich Stärke. Von den 4 stark gewelkten Hälften aus der trockenen Schale zeigten 2 schätzungsweise denselben, die beiden übrigen einen etwas geringeren Stärkegehalt als die feucht gehaltenen Teilstücke jeweils derselben Blätter.

Es vollzog sich offenbar in der trockenen Schale das Welken mit solcher Geschwindigkeit (die Blatthälften erkennbar welk nach 5 Minuten!), daß die Umsetzungen zum Stillstand kamen lange ehe die Stärke verschwunden war, in 2 Fällen sogar ehe überhaupt eine erkennbare Abnahme stattgefunden hatte.

Unter der später zu besprechenden Voraussetzung, daß nicht der Wasserverlust das Verschwinden der Stärke verursache, sondern daß das Verhältnis Stärke zu Zucker abhänge von dem gegebenen Wassergehalt, versuchten wir Neubildung der Stärke zu erzielen durch Wasserzufuhr zu infolge Welkens stärkefreien Blatthälften, doch ohne sicheren Erfolg.

Versuch 4 (26. IV. 1921): 5 halbierte Blätter von *Mnium cuspidatum* wurden 24 Stunden ausgelegt wie im Versuch 2 die trockene Serie (auf trockenem Objektträger in feuchter Schale). Nachdem in einem Blatte (beide Hälften geprüft) die Stärke verschwunden war, wurden vom Rest je eine Hälfte (Kontrolle) in Alkohol gebracht, die andere Hälfte 24 Stunden auf Wasser schwimmend gehalten. Das Ergebnis war folgendes. Bei 2 Blättern zeigten beide Hälften, sowohl die unmittelbar nach dem Trocknen in Alkohol gelegte wie die danach 24 Stunden auf Wasser verbrachte keine Stärke. Bei den beiden übrigen Blättern waren die ersteren (Kontrollen) gleichfalls stärkefrei, die anderen enthielten geringe Mengen kleiner verschwommener Körnchen, die jedoch nicht mit Sicherheit identifiziert werden konnten.

[1]) Nur die Zellen der Schnittränder führten Stärke. Zur Deutung dieser auch von *Molisch* gemachten Beobachtung bringt die Dissertation von Frl. *Horn* einige Versuche.

In einer unten zu erwähnenden Arbeit beschreibt *Lundegardh* einen gleichgerichteten Versuch, der ebenfalls, wenn auch aus anderen Gründen, kein einwandfreies Resultat gab.

Unser Ergebnis deckt sich völlig mit dem, das *Molisch* 1914 erhalten hatte, und das er nunmehr publiziert hat. Es verschwindet die Stärke aus dem isolierten, dunkel gehaltenen welkenden Blatt von Tropäolum majus rascher als aus dem sonst gleichbehandelten turgescenten. Dieser Befund ist nicht so neu, wie *Molisch* glaubt. In einer im Jahre 1914 erschienenen Abhandlung, betitelt „Einige Bedingungen der Bildung und Auflösung der Stärke" beschreibt *Lundegardh*[1]) Versuche mit Samen und Keimlingen höherer Pflanzen, denen zufolge die beim Quellen oder im Verlauf der ersten Keimungsstadien in den Embryonen auftretende Stärke beim Eintrocknen wieder verschwindet. Er erklärt dies durch Rückwanderung und glaubt nicht an die allgemeine Gültigkeit. Ferner fand er an den Blättern einiger Moosarten bei Wasserentzug durch Plasmolyse[2]) Abnahme der Stärke oder gänzliches Verschwinden. Er folgert aus seinen Befunden, daß bei Wasserverlust in der Zelle die Stärke aufgelöst werde, bemerkt aber, daß diese Erscheinung nicht generell sein dürfte (Reservestoffbehälter!). Unter der Annahme, daß Hydrolyse der Stärke zu Zucker stattfinde, denkt er sich das Gleichgewicht Stärke zu Zucker durch den Wassergehalt beeinflußt.

1915 veröffentlichte *Neger*[3]) ähnliche Beobachtungen. Er arbeitete mit abgeschnittenen Laubblättern höherer Pflanzen und fand für krautige Blätter beim Welken und Trocknen im Dunkeln Verschwinden der Stärke. Trockengewichtsbestimmungen sowie Messung der produzierten Kohlensäure zeigten ihm, daß dieses Verschwinden nicht mit Verbrauch zu Atmungszwecken erklärt werden könne. Deshalb nahm auch er im Gedanken an *Schimpers* Resultate an — *Lundegardhs* Arbeit scheint ihm unbekannt geblieben zu sein — die Stärke werde in Zucker verwandelt. In einer Fußnote sagt er: „Merkwürdigerweise ist die Umwandlung der Stärke in Zucker um so lebhafter, je rascher das Welken erfolgt"[4]).

[1]) *H. Lundegardh*, Jahrb. f. wiss. Botan. **53**, 421. 1914.

[2]) Der Versuch *Lundegardhs* über das Verschwinden der Stärke aus welkenden Homaliablättern ist nicht beweisend. Er wird daher von *Lundegardh* selbst nur mit Vorbehalt benutzt. *Lundegardhs* Versuche (l. c. S. 457) durch Plasmolysieren von Blattquerschnitten höherer Pflanzen Stärkeschwund herbeizuführen, zeitigten kein deutliches Ergebnis, was vielleicht mit der Auswahl des Versuchsmaterials zusammenhängt.

[3]) *Neger*, Naturwiss. Wochenschr. f. Forst- u. Landwirtschaft **13**, 370. 1915.

[4]) In dieser uneingeschränkten Form ist der innerhalb gewisser Grenzen gültige Satz nicht aufrechtzuerhalten. Bei allzu raschem Welken kann die Stärkeabnahme ausbleiben (siehe oben S. 167). Ferner ist zu untersuchen, ob die Geschwindigkeit des Welkens, also des Wasserverlustes, oder der danach gegebene geringe Wassergehalt der wirksame Faktor sei.

Es steht also nach diesen übereinstimmenden Befunden fest, daß beim Welken verdunkelter detachierter Blätter von Tropäolum [und anderen[1])] die Stärke, unter Umständen bis zum völligen Verschwinden, abnimmt.

II. Der Rohrzuckergehalt.

Die vorliegenden Untersuchungen über das Verhalten der Zucker im welkenden Blatt und über das Schicksal der verschwindenden Stärke sind ungenügend und unbefriedigend. *Lundegardh* hat gelegentlich mikrochemisch (Reduktionsvermögen gegen Kupferlösung) nach direkt reduzierenden Zuckern gesucht und z. B. bei Homalia stets, selbst nach Verweilen auf Traubenzuckerlösung, nur sehr geringe Mengen gefunden. *Neger* stellte zufolge einer kurzen Fußnote, gleichfalls mikrochemisch (nach *Schimpers* Verfahren), fest, daß die gewelkten Blätter direkt reduzierenden Zucker führten, über Kontrolle mit turgescenten sagt er nichts. *Molisch* teilt makrochemische Analysen mit, aus denen er schließt, daß der Stärkeabnahme eine entsprechende Zuckerzunahme (Glucose) nicht gegenüberstehe[2]).

Auch wir konnten uns aus unseren Analysen des Jahres 1920 keine gesicherte Vorstellung bilden. Erst nachdem wir im Sommer 1921 dazu übergegangen waren, die Extrakte vor der Zuckerbestimmung mit Bleiessig (Liquor plumbi subacetici) zu reinigen, ergab sich mit aller Schärfe, daß in verdunkelten, abgeschnittenen Blättern von Tropäolum das Reduktionsvermögen erhalten infolge Inversion mit 4 proz. Citronensäure[3]) beim Sinken des Wassergehaltes zunimmt, daß also der Gehalt an einem Zucker, der danach mit größter Wahrscheinlichkeit als *Rohrzucker* anzusprechen ist, bei sinkendem Wassergehalt steigt. Das zeigt der nächste Versuch, er ist, wie alle nunmehr folgenden, mit detachierten Tropäolumblättern angestellt, die nach der Ernte, gleichfalls in allen folgenden Versuchen, dunkel gehalten wurden.

Versuch 5 (20. VI. 1921): Ernte 3^h $40'$ nachmittags. 40 Blätter (ausgewähltes Material aus umfangreicher Kultur auf Versuchsbeet) wurden halbiert und von jedem einzelnen Blatte die eine Hälfte zu Serie A, die andere zu Serie B gelegt. (So auch, wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt, in allen folgenden Versuchen.)[4])

---

[1]) Siehe im folgenden S. 186.

[2]) Siehe dazu im folgenden S. 178.

[3]) Über die Methodik finden sich einige Bemerkungen im Anhang.

[4]) Die Wassergehaltsbestimmungen erfolgten durch Trocknen des, gleich nach der Ernte frisch gewogenen, extrahierten Materiales. Sie sind, da durch die Extraktion Trockensubstanz entfernt wurde, zu hoch und daher nur für den Vergleich innerhalb des Versuches zu verwenden. Wenn die Versuchshälften eine Zunahme des Gesamtzuckergehaltes zeigten, wurde der damit gegebene größere Extraktionsverlust bei der Berechnung berücksichtigt. Eine Besprechung der Fehlergrößen bringt die Dissertation von Frl. *Horn*.

Behandlung	Wasser-gehalt %	Rohrzucker absolut mg	Rohrzucker pro Mille d. Trockensubstanz	Stärke
A. 40/2 Blätter sofort analysiert (Kontrollhälften) .	85,8	275,64	92	viel
B. 40/2 Blätter n. 24 Stdn. Trockenliegen (auf Porzellanteller im Dunkelzimmer) analysiert (Versuchshälften)	67,6	398,4	139	keine
		Zunahme:	47	

In einem weiteren Versuch wurden die Versuchshälften, um die gleiche Tageszeit geerntetes Material, sehr feucht gehalten in der Weise, daß die Spreiten mit ihrer Unterseite auf Wasser schwammen, die Stiele eintauchten:

Versuch 6 (23. VI. 1921): Ernte $3^h\,55'$ nachmittags.

Behandlung	Wasser-gehalt %	Rohrzucker absolut mg	Rohrzucker pro Mille	Stärke
A. 20/2 sofort analysiert (Kontrollhälften)	85,9	122,3	88	mäßig
B. 20/2 vor der Analyse 20 Stunden auf Wasser schwimmend gehalten (Versuchshälften)	97	79,5	63	kaum weniger
		Abnahme:	25	

Es ist also in diesem Versuch nicht nur die Zunahme des Rohrzuckers unterblieben, sondern dieser hat vielmehr abgenommen.

Ein Vergleich der Analysen des Jahres 1920 ohne Extraktreinigung durch Bleiessig mit denen des Jahres 1921 mit gereinigtem Extrakt ergab, daß der Rohrzuckergehalt, wie er aus der Zunahme des Reduktionsvermögens nach Citronensäurebehandlung berechnet wurde, beide Male innerhalb des Rahmens der vorkommenden Schwankungen der gleiche war. Wir dürfen daher für den Rohrzucker [nicht für die übrigen Zucker[1])] diese Versuche, in welchen der ungereinigte Extrakt analysiert

[1]) Die Reinigung mit Bleiessig wird u. a. mit $^n/_1$-Salzsäure hydrolysierbare zuckerhaltige Substanzen (Glykoside) [*Brown* und *Morris* geben an, daß „Tannin" vorhanden sei, wenn auch nicht in sehr großen Mengen (l. c. S. 663)] aus dem Extrakt entfernt haben. Ein Vergleich der Analysen von gereinigtem und ungereinigtem Extrakt ergab für diesen eine sehr viel stärkere Zunahme des Kupferreduktionsvermögens nach der Salzsäureinversion als für jenen. Berechnet man aus diesen Zunahmen den Maltosegehalt, so findet man für den gereinigten Extrakt zwischen 8 und 30, für den ungereinigten 70—110 pro Mille der nach Extraktion verbleibenden Trockensubstanz. Die zweite Zahl halten wir aus dem eben angeführten Grunde

wurde, anführen (Versuch 7—9). Sie ergaben gleichfalls deutlich Zunahme des Rohrzuckergehaltes beim Welken.

Versuch 7 (27. VII. 1920): Ernte 3h 15′ nachmittags (ohne Bleiessigbehandlung).

Behandlung	Wassergehalt %	Rohrzucker absolut	Rohrzucker pro Mille Trockensubstanz	Stärke
A. 34/2 Blätter sofort analysiert	88,6	159	83	reichlich
B. 34/2 nach 24 Stunden Trockenliegen analysiert	48,5	233,7	135	keine
			Zunahme: 52	

Versuch 8 (5. VIII. 1920): Ernte 1h 45′ nachmittags (ohne Bleiessigbehandlung).

Behandlung	Wassergehalt %	Rohrzucker absolut	Rohrzucker pro Mille Trockensubstanz	Stärke
A. 33/2 Blätter sofort analysiert	88,7	129	59	reichlich
B. 33/2 nach 48 Stunden Trockenliegen analysiert	33	195,7	110	keine
			Zunahme: 51	

Versuch 9 (9. VIII. 1920): Ernte 3h nachmittags (ohne Bleiessigbehandlung).

Behandlung	Wassergehalt %	Rohrzucker absolut	Rohrzucker pro Mille Trockensubstanz	Stärke
A. 50/3 sofort analysiert	87,25	151,9	74	reichlich
B. 50/3 nach 24 Stunden Trocknen analysiert	57,3	188,9	108	keine
C. 50/3 nach 48 Stunden Trocknen analysiert	33,95	216,3	118	keine
			Zunahme: 34 und 44	

Es genügte bereits kurzfristiges Trockenhalten, also geringe Welkungsgrade, um eine eben analytisch nachweisbare Rohrzuckerzunahme zu bewirken.

für unrichtig. Da nun der Gehalt an Hexosen erst nach Abzug des auf die Maltose entfallenden Anteils an der direkten Reduktion berechnet werden kann, ist es zu verstehen, daß mit Fehlern der angegebenen Größe in der Maltosebestimmung die Zahlen für Hexosen gleichfalls wertlos werden.

Versuch 10[1]) (27. VI. 1921): Ernte 2h 10′ nachmittags.

Behandlung	Wassergehalt %	Rohrzucker absolut mg	Rohrzucker pro Mille	Stärke
A. 26/2 Blätter sofort analysiert	86,04	258,63	109	mäßig
B. 26/2 Blätter nach der Ernte 4 Stdn. trocken, dann analysiert	83,2	299,44	119	weniger
		Zunahme: 10		

Weiterhin konnten wir feststellen, daß für den Rohrzucker eine reversible Abhängigkeit vom Wassergehalt besteht. Denn bei steigendem Wassergehalt ging der Rohrzuckergehalt, sofern vorher durch leichtes Anwelken seine Erhöhung herbeigeführt war, wieder zurück.

Versuch 11 (29. VI. 1921): Ernte 1h nachmittags.

Behandlung	Wassergehalt %	Rohrzucker absolut mg	Rohrzucker pro Mille	Stärke
A. 25/2 Blätter nach der Ernte 5 Stdn. trocken gehalten, dann analysiert	81,1	235,7	116	mäßig
B. 25/2 Blätter zuerst 5 Stunden trocken, dann 22 Stdn. auf Wasser schwimmend, danach analysiert	97,3	121,11	64	weniger
		Abnahme: 52		

Mit diesem Befund wird die oben im Versuch 6 gefundene Rohrzuckerabnahme zu erklären sein, denn der Wassergehalt der Versuchshälften stieg während des Versuches. Die Blätter enthielten also nach 24stündigem Schwimmen auf Wasser mehr Wasser und weniger Rohrzucker als unmittelbar nach der Ernte. Dasselbe gilt für den folgenden Versuch 12. Wir machen allerdings in diesen beiden Fällen (Versuch 6 und 12) die Annahme, daß die für detachierte Blätter erkannte Gesetzmäßigkeit auch für solche gelte, die sich an der Pflanze befinden[2]).

Versuch 12 (11. VII. 1921): Ernte 3h 50′ nachmittags (Serie A und B bestehen diesmal ausnahmsweise aus Hälften verschiedener Blätter).

---

[1]) Dieser wieder, wie alle folgenden, mit Bleiessigbehandlung. Versuch 7—9 sind die einzigen in dieser Arbeit veröffentlichten Versuche ohne Bleiessigbehandlung.

[2]) Siehe darüber im folgenden S. 184.

Behandlung	Wasser-gehalt %	Rohrzucker absolut mg	Rohrzucker pro Mille	Stärke
A. 20/2 sofort nach Ernte analysiert	88,3	170,43	98	wenig
B. 20/2 nach 24 Stdn. Verw. auf Wasser analysiert	95,5	79,53	48	weniger?
			Abnahme: 50	

Hier sei mit einigen Worten einer abweichenden Erklärungsmöglichkeit gedacht, dahingehend, daß in unseren Versuchen mit Blättern, deren Stiele eintauchten und deren Unterseiten auf Wasser schwammen, nicht die Wasserzufuhr, sondern der infolge des Ausschaltens der Spaltöffnungen ungenügende Sauerstoffzutritt den Stärkeschwund verhindert und die Rohrzuckerabnahme bewirkt habe. Für den Stärkeschwund ist dieser Gedanke bereits widerlegt. In unseren Versuchen mit Moosen schwammen die feucht gehaltenen Blatthälften nicht auf Wasser, sondern lagen auf nassem Papier, sie behielten ihre Stärke. Sie verloren diese aber in Versuchen *Lundegardhs* in plasmolysierenden Flüssigkeiten, also bei weniger ergiebiger Versorgung mit Sauerstoff. *Molisch* verhinderte das Welken unter anderem dadurch, daß er die Blätter in dampfgesättigte Atmosphäre brachte, auch dann blieb die Stärke erhalten.

Es trägt das Blatt von Tropäolum beiderseits Spaltöffnungen, oberseits auf dem Quadratmillimeter 100—125, unterseits 235—280. Es werden also beim Schwimmen mit der Spreitenunterseite auf Wasser etwa $^2/_3$ der Spaltöffnungen ausgeschaltet. Der verbleibende Rest ($^1/_3$) wird aber bei der relativ geringen Dicke des Blattes zur Sauerstoffversorgung genügen, wofür wir folgende Überlegung anführen. Die Atmung eines Blattes produziert vielleicht den 10. Teil der Kohlensäure, welche die Assimilation in der gleichen Zeit verbraucht. Die Konzentration des Sauerstoffes in der Luft beträgt das 500—700fache derjenigen der Kohlensäure. Wenn also zur Erzielung der assimilatorischen Höchstleistung alle Spalten nötig sind, wird der Sauerstoffbedarf der Atmung durch $^1/_3$ bequem gedeckt werden können. *Molisch* ließ Blätter (gleichfalls Tropäolum) mit der Oberseite auf Wasser schwimmen und verhinderte auf diese Weise unter Ausschalten von $^1/_3$ der Spaltöffnungen Stärkeschwund[1]).

[1]) Um jeden Einwand zu prüfen, soll im nächsten Sommer, wenn dies methodisch möglich ist, die Wegsamkeit des Mesophylls unterhalb der Spalten der Oberseite mit der oberhalb derjenigen der Unterseite verglichen werden. (*Neger*, Ber. d. Dtsch. botan. Ges. **30**, 188. 1912.) Außerdem sind Zuckerbestimmungen von Blättern, die im dunstgesättigten Raume gehalten wurden, vorgesehen.

Es ist aber zu untersuchen, ob nicht gerade umgekehrt die im Dunkeln welkenden Blätter schlechter mit Sauerstoff versorgt waren als die mit den Unterseiten auf Wasser schwimmenden. Tropäolum gehört zu den Pflanzen, deren Spalten sich beim Welken schließen [*Stahl*[1]) Nachweisverfahren: Kobaltpapier]. Nach unseren gelegentlichen Befunden waren die Spalten der welkenden Blätter nicht immer oder nicht immer alle geschlossen und wir hatten den Eindruck, als ob die Geschwindigkeit des Wasserverlustes den Vorgang beeinflusse (Nachweisverfahren: *Molischs* Methode). Wenn wir also die eben supponierte Erklärung unserer Befunde ablehnen, wollen wir damit nicht sagen, daß die Sauerstoffversorgung für Art und Menge der Kohlenhydrate im Blatt gleichgültig sei. Nach *Neger* unterbleibt der Stärkeschwund beim Welken im Wasserstoffstrom. *Lundegardh* berichtet für Samen über einen abweichenden Befund[2]). *Neger* denkt an Ausbleiben der Enzymbildung bei Sauerstoffmangel. Man könnte sich aber auch vorstellen, daß die bei Abwesenheit von Sauerstoff verlaufende intramolekulare Atmung andere Zucker angreift als die normale. Der eine von uns beabsichtigt, diese Fragen demnächst bearbeiten zu lassen.

III. Die Herkunft des Rohrzuckers.

Die Herkunft und, soweit dies überhaupt schon möglich ist, die Bedeutung des Rohrzuckers kann erst besprochen werden, wenn das Verhalten der übrigen vorkommenden Zucker (Hexosen, Maltose) unter den eingehaltenen Versuchsbedingungen bekannt ist. Der Gehalt an Hexosen und Maltose wurde in den bisher aufgeführten Versuchen zusammen mit dem Rohrzuckergehalt bestimmt und zwar in der Weise, daß auf die Citronensäureinversion eine Hydrolyse mit $^{n}/_{1}$-Salzsäure folgte. Aus der sich bei dieser Behandlung ergebenden Zunahme des Reduktionsvermögens wurde der Maltosegehalt berechnet und ein deren Menge entsprechender Betrag von der bei der Reduktion des nicht invertierten Extraktes gefundenen Kupfermenge abgezogen. Der danach verbleibende Rest wurde als Reduktionsvermögen der Hexosen angesehen und deren Menge daraus berechnet.

Gegenüberstehend die Übersicht über die Resultate (s. S. 175).

Wenn wir von dem kurzfristigen Versuch 16a absehen, nahm also der Hexosengehalt der verdunkelten detachierten Blätter stets zu, der Rohrzuckergehalt nur dann, wenn der Wassergehalt sank, im umgekehrten Falle fiel er. Es kann daher in abgeschnittenen Blättern die Menge beider Zucker steigen (Versuch 13, Material trocken gehalten) oder aber, bei Vermehrung des Wassergehaltes, die Hexosenmenge

[1]) *Stahl*, Botan. Ztg. 52 (Abt. I), 120. 1894.
[2]) l. c. S. 461.

Behandlung	Wassergehalt	Zucker (absolut)				Zucker pro Mille Trockensubst.				Stärke
		Gesamtzucker*)	Hexosen	Rohrzucker	Maltose	Gesamtzucker	Hexosen	Rohrzucker	Maltose	
Versuch 13 (= Vers. 5)										
A. Sofort analysiert .	85,8	429,74	78	275,64	56,34	144	26	92	19	viel
B. 24 Stdn. trocken, dann analysiert . .	67,9	758,13	293	398,4	44,52	264	102	139	16	keine
						+120	+76	+47	−3	
Versuch 14 (= Vers. 6)										
A. Sofort analysiert .	85,9	183,97	43	122,3	11	133	31	88	8	mäßig
B. Nach 24 Stdn. auf Wasser analysiert.	97	167,67	67,07	79,48	16,15	133	53	63	13	kaum weniger
						+0	+22	−25	+5	
Versuch 15 (= Vers. 11)										
A. Nach 5 Stunden Trocknen analysiert	81,1	398,02	109,23	235,51	40,44	196	54	116	20	mäßig
B. Zuerst 5 Stunden trocken, dann 24 Stunden auf Wasser, danach analysiert. .	97,3	302,03	155,87	121,11	16,27	160	83	64	9	weniger
						−36	+29	−52	−11	
Versuch 16 (= Vers. 12)										
A. Sofort analysiert.	88,3	250,39	2,76	170,43	60,09	144	2	98	35	wenig
B. Nach 24 Stdn. auf Wasser analysiert.	95,5	153,18	45,7	79,53	20,94	92	28	48	13	weniger?
						−52	+26	−50	−22	
Versuch 16a (= Vers. 10)										
A. 26/2 Blätter sofort analysiert	86,04	468,06	137,82	258,63	55,13	197	58	109	23	mäßig
B. 26/2 Blätter nach der Ernte 4 Stdn. trocknen, dann analysiert.	83,2	516,1	139,1	299,44	57,79	205	55	119	19	weniger
						+8	−3	+10	−4	

*) Als Invertzucker, ebenso in allen übrigen Tabellen.

zunehmen, während der Rohrzucker abnimmt (Versuch 14—16). Auf dieses Ergebnis wollen wir besonders hinweisen. Denn danach ist die Zu- oder Abnahme des Rohrzuckergehaltes unabhängig von Veränderungen des Hexosengehaltes, wodurch die Vorstellung, die Zunahme der Hexosen bewirke gewissermaßen rückstauend Vermehrung des Rohrzuckers, unhaltbar wird. Aus der Tatsache, daß die Mengenänderungen beider Zuckerarten je nach den Außenumständen gleichsinnig oder gegensinnig verlaufen können, wird man also schließen dürfen, daß der Rohrzucker nicht einen transitorischen Reservestoff, gebildet bei Hexosenüberschuß, darstelle.

Daß die Stärke letzten Endes das Material für den bei Rückgang des Wassergehaltes auftretenden Rohrzucker liefert, ergibt der Versuch 13, in welchem sowohl Hexosen wie Rohrzucker stark zunehmen,

der Maltosegehalt etwa gleichbleibt und die Stärke verschwindet. Diesen Schluß bestätigen die folgenden Versuche mit stärkefreien oder stärkearmen Blättern. Bei ihnen wurde aus äußeren Gründen die Citronensäurehydrolyse unterlassen. Es stehen uns diesmal also nur die Kupferwerte für den unbehandelten und den total (mit Salzsäure) hydrolysierten Extrakt zur Verfügung. Da aber das Kupferreduktionsvermögen des ersteren gering, das des letzteren groß war, kann auf Grund der folgenden Doppelrechnung ein oberer und ein unterer Grenzwert des Rohrzuckergehaltes mit Bestimmtheit angegeben werden.

Zur Berechnung des oberen Grenzwertes nehmen wir an, es seien von direkt reduzierenden Zuckern allein Hexosen anwesend gewesen, Maltose habe gänzlich gefehlt. Dann ist die Zunahme des Reduktionsvermögens infolge der Salzsäurehydrolyse lediglich durch Rohrzuckerinversion verursacht. Seine Menge kann also für diesen Fall aus den Tabellen entnommen werden.

Das andere Extrem wäre gegeben bei alleiniger Gegenwart von Maltose und der Abwesenheit von Hexosen. Berechnet man unter dieser Voraussetzung aus dem direkten Reduktionsvermögen die Maltose, so kann man weiter berechnen, um welchen Betrag das Reduktionsvermögen des Extraktes infolge der Maltosehydrolyse steigen mußte. Zieht man diesen Wert von der tatsächlich gefundenen Zunahme ab, so bleibt ein Rest, der durch Rohrzuckerinversion verursacht ist. Auf diese Weise erhält man die untere Grenze des Rohrzuckergehaltes.

Zwischen diesen beiden Extremen muß der wahre Rohrzuckergehalt gelegen haben.

So sind die Zahlen der folgenden Tabellen (Versuch 17—19) gewonnen. Bei den Angaben für Hexosen und Maltose handelt es sich demnach nicht um ein „und", sondern um ein „entweder oder" und es kann natürlich auch eine intermediäre Verteilung bestanden haben.

Versuch 17 (3. VIII. 1921): Ernte 5^h vormittags.

Behandlung	Wassergehalt	Zucker (absolut)					Zucker pro Mille Trockensubstanz					Stä
		Gesamtzucker	direkt reduz.		Rohrzucker		Gesamtzucker	direkt reduz.		Rohrzucker		
			als Hexosen	als Maltose	Höchst-Gehalt	Geringstgehalt		als Hexosen	als Maltose	Höchst-Gehalt	Geringstgehalt	
A. 25 2 Blätt. sofort nach Ernte analys.	89,4	137,99	11,8	oder 23	119,67	109	83	7	oder 14	72	66	ke
B. 25 2 Blätt. nach d. Ernte 26 St. trock., dann analys.	69,3	89,51	13,2	oder 24	72,8	61,5	56	8	oder 15	45	37,5	ke

Es erscheint unwahrscheinlich, daß in diesem Versuch Maltose, das intermediäre Abbauprodukt der schon dem Ausgangsmaterial fehlenden Stärke, in irgendwie erheblichen Mengen vorhanden gewesen sei. Deshalb dürfte der obere Grenzwert für den Rohrzuckergehalt der Wahrheit ziemlich nahe kommen. Doch erübrigt diesmal überhaupt eine Entscheidung, denn das Resultat ist ohnehin auf alle Fälle eindeutig. Es ergibt sich, wie man auch rechnen mag, eine starke Rohrzuckerabnahme in den stärkefreien, welkenden Blättern, selbst dann wenn man die dafür rechnerisch ungünstigste Annahme macht, daß bei der Ernte nur Maltose und nach dem Trocknen nur Hexosen anwesend gewesen seien. Und der Betrag der Abnahme erreicht eine Höhe, die ihr Bestehen unzweifelhaft macht, auch wenn man berücksichtigt, daß die bei Bestimmung der direkten Reduktion gefundenen Kupfermengen so gering waren, daß die Zuckerwerte als außerhalb der Tabelle gelegen extrapoliert werden mußten.

Das stärkefreie Blatt verringert also im ausgesprochenen Gegensatz zum stärkeführenden beim Welken seinen Rohrzuckergehalt[1]).

Im folgenden Versuch (18) enthielten die Blätter etwas, wenngleich sehr wenig Stärke. Diese verschwand, im Einklang mit allen übrigen Versuchen, aus den welkenden Blättern, erhielt sich aber in den auf Wasser schwimmenden.

Versuch 18 (9. VIII. 1921): Ernte 5^h vormittags. Verschiedene Blätter.

Behandlung	Wassergehalt	Zucker (absolut): Gesamtzucker	Zucker (absolut): direkt. reduz. als Hexosen	Zucker (absolut): direkt. reduz. als Maltose	Zucker (absolut): Rohrzucker Höchstgehalt	Zucker (absolut): Rohrzucker Geringstgehalt	Zucker pro Mille Trockensubstanz: Gesamtzucker	Zucker pro Mille Trockensubstanz: direkt. reduz. als Hexosen	Zucker pro Mille Trockensubstanz: direkt. reduz. als Maltose	Zucker pro Mille Trockensubstanz: Rohrzucker Höchstgehalt	Zucker pro Mille Trockensubstanz: Rohrzucker Geringstgehalt	Stärke
A. 15 l sof. n. d. Ernte analysiert . . .	88,4	243,8	29,4 oder	53,6	204	177	99	12 oder	22	83	72,5	sehr wenig
B. 15 l n. d. Ernte 26 St. trock., dann analysiert .	71	220,5	51,74 oder	94,1	162	114	119	27 oder	50	86	63	keine
C. 15 l n. d. Ernte 26 St. auf Wasser schwimm., dann analys.	96	181,33	31,69 oder	57,7	142	112	86	15 oder	27	67	52,8	sehr wenig

Es ergibt sich also aus Versuch 18 für die auf Wasser gehaltenen Blätter trotz der bleibenden Gegenwart der geringen Stärkemengen,

[1]) Es wäre danach denkbar, daß das trocken gelagerte stärkefreie Blatt sein Wasser rascher verliert als das stärkeführende, vorausgesetzt, daß nicht ein Eingreifen der Hexosen stattfindet oder die Spaltöffnungen ungleiches Verhalten zeigen.

einerlei als was man die direkt reduzierenden Zucker berechnet, eine Rohrzuckerabnahme, entsprechend dem Resultat aller früheren Versuche. In den trocken gehaltenen Blättern schwand die Stärke und, wenn überhaupt eine Rohrzuckerabnahme eintrat, blieb diese hinter der bei den turgescenten gefundenen zurück. Es ist aber gar nicht sicher, daß in den welkenden Blättern dieses Versuches der Rohrzucker wirklich abgenommen habe. Denn wenn man die wahrscheinlichsten Werte allein betrachtet, ergibt sich Gleichbleiben des Rohrzuckergehaltes. Es dürfte also vermutlich die geringe Stärkemenge gerade gereicht haben, eine Rohrzuckerverringerung hintanzuhalten, wenn sie auch zum Bewirken einer Steigerung nicht genügte.

Versuch 19 **(14. VIII. 1921): Ernte 4^h 30′ vormittags. Verschiedene Blätter.**

Behandlung	Wassergehalt	Zucker (absolut)					Zucker pro Mille Trockensubstanz					Stärke
		Gesamtzucker	direkt reduz.		Rohrzucker		Gesamtzucker	direkt reduz.		Rohrzucker		
			als Hexosen	als Maltose	Höchstgehalt	Geringstgehalt		als Hexosen	als Maltose	Höchstgehalt	Geringstgehalt	
A. 15 1 sof. n. d. Ernte analysiert . . .	89,5	186	10.6 oder 19		168	157	82	5 oder 8,4		74	69	Spuren
B. 15 1 n. d. Ernte 27 St. trock., dann analysiert .	46,5	208,5	45,6 oder 83,6		155	111	92	20 oder 37		69	49,1	keine
C. 15 1 n. d. Ernte 28 St. auf Wasser, dann analys.	97,5	137	20,7 oder 39,6		110	91	70	11 oder 22		56	46,5	Spuren

In diesem Versuch, Spuren von Stärke im Ausgangsmaterial, zeigt sich sowohl bei den trocken wie bei den feucht gehaltenen Blättern Rohrzuckerabnahme; die Spuren von Stärke konnten diese also nicht aufhalten. Doch glauben wir mit ziemlicher Bestimmtheit sagen zu dürfen, daß die Abnahme in dem turgescenten Material einen höheren Betrag erreichte als in dem welkenden.

An dieser Stelle seien einige Worte über *Molischs* Zuckerbestimmungen eingeschaltet. *Molisch* schreibt: „Die welken Blätter enthalten (bezogen auf trockene Substanz):

Nach Analyse I. 4,6% direkt reduzierende Substanzen
„ „ II. 4,1% „ „ „
„ „ I. 15,3% nach Inversion reduzierende Substanzen
„ „ II. 14,9% „ „ „ „

Die turgescenten Blätter enthalten:

Nach Analyse I. 6,4% direkt reduzierende Substanzen
„ „ II. 7,3% „ „ „
„ „ I. 14,2% nach Inversion reduzierende Substanzen
„ „ II. 13,8% „ „ „ „

Wie aus der Tabelle hervorgeht, hat sich meine Vermutung, daß die welken Blätter, die während der Nacht ihre Stärke vollends oder fast vollends eingebüßt hatten, mehr reduzierende Substanz enthalten dürften, nicht bestätigt, denn laut beiden Analysen war die Menge reduzierender Substanzen gerade bei den turgescenten beträchtlich größer, trotzdem sie nur einen Teil der Stärke umgewandelt hatten." *Molisch* sucht diesen Widerspruch damit zu erklären, daß er annimmt, „bei der Stärkeumwandlung der welken Blätter entstünde nicht bloß Glucose, sondern noch andere Stoffe (vielleicht Dextrine und verwandte Substanzen)".

Stellt man mit *Molischs* Analysenresultaten folgende Rechnung an:

Welke Blätter:

Analyse I a) Nach Inversion reduzierend	15,3
b) ab direkt reduzierend	4,6
Zunahme des Reduktionsvermögens durch die Inversion	10,7

Analyse II ebenso a)	14,9
ab b)	4,1
Zunahme	10,8

Turgescente Blätter:

Analyse I a)	14,2
ab b)	6,4
Zunahme	7,8

Analyse II a)	13,8
ab b)	7,3
Zunahme	6,5

Oder die welken Blätter enthalten, bezogen auf trockene Substanz, im Mittel 10,75, die turgescenten 7,15 nach Inversion reduzierende Stoffe. Soweit ohne Kenntnis des Inversionsverfahrens und anderer methodischer Einzelheiten ein Urteil möglich ist, deckt sich dies Resultat, das *Molisch* nicht erkannt hat, mit dem unsrigen. Allerdings nehmen wir dabei an, daß *Molischs* Angabe „nach Inversion" das gesamte nach dieser beobachtete Reduktionsvermögen enthalte, und daß ein Abzug für die direkt reduzierenden Stoffe von ihm nicht schon gemacht worden ist. Wir halten uns dazu für berechtigt, da *Molisch* sagt: „Ein Teil des Extraktes wurde sofort zur Bestimmung des Zuckers nach *Allihn* durch Reduktion des Kupfers verwendet, der andere Teil wurde invertiert und dann die Menge der reduzierenden Substanzen bestimmt." Woran dann unmittelbar die oben wiedergegebene Mitteilung der Analysen anschließt[1]).

[1]) Über den für die direkt reduzierenden Zucker zwischen unseren Befunden und denen *Molischs* bestehenden Widerspruch siehe die folgende Seite.

IV. Die Hexosen.

Das Verhalten der Hexosen muß noch weiter untersucht werden. Feststehen dürfte, daß in während des Tages, also bei Belichtung, geernteten Blättern, die stärkehaltig waren und sofort nach dem Abschneiden verdunkelt wurden, der Hexosengehalt steigt. Denn mit Ausnahme des kurzfristigen Versuches (Nr. 10) fanden wir, wie seinerzeit *Brown* und *Morris*, dieses Verhalten durchweg.

Nicht ebenso bestimmt können wir uns darüber äußern, ob diese Zunahme in den welkenden Blättern stets einen höheren Wert erreicht als in den feucht gehaltenen. In unseren Versuchen war dies die Regel, so in Versuch 13 verglichen mit 14—16 (Zunahme im ersteren Fall rund das 3fache wie in den 3 anderen). Und auch die Versuche mit stärkearmen Blättern (18 und 19), in welchen die Citronensäureinversion unterlassen wurde, ergaben für die welkenden Blätter eine höhere Zunahme des direkten Reduktionsvermögens als für die turgescenten, letztere zeigen in diesen Versuchen eine sehr geringe Steigerung des direkten Reduktionsvermögens. Vielleicht steht dies mit dem geringen Stärkegehalt in Zusammenhang; denn im Versuch 17 mit völlig stärkefreien Blättern blieb das Reduktionsvermögen (direkt), hier sogar für welkende Blätter, unverändert.

Molisch hat nun im Gegensatz zu unseren Befunden ein höheres direktes Reduktionsvermögen in den turgescenten Blättern (das Ausgangsmaterial hat er nicht analysiert). Wir glauben nicht, daß dieser Widerspruch damit zu erklären ist, daß *Molisch* anscheinend den Extrakt nicht gereinigt hat. Ebensowenig wird man das Unterlassen einer Trennung von Hexosen und Maltose bei *Molischs* Analysen als Erklärung für den abweichenden Befund gelten lassen können. Denn wir haben, wenn wir in unseren Versuchen die direkte Reduktion als Einheit nehmen, doch die höhere Zunahme bei den welkenden Serien, auch in den Versuchen 18 und 19 (ohne Citronensäureinversion) mit unverletzten Blättern. Wenn zur Erklärung des übrigens sicherzustellenden Widerspruchs heute eine Vermutung geäußert werden kann, so möchten wir daran denken, daß *Molisch* seine Blätter im dunstgesättigten Raum hielt, Transpiration und Wasserbewegung in den Blättern also ausschaltete, während unser Material mit eintauchenden Stielen auf Wasser schwamm, also wohl eine langsame zentrifugale Wasserbewegung aufwies[1]).

[1]) Man wird im Gedanken an eine an der Schnittfläche beginnende Rückstauung der Hexosen die Länge der Stielstümpfe beachten müssen, die während des Versuches mit der Lamina verbunden sind und vor der Analyse entfernt werden. Wir ließen in allen Versuchen (ausgenommen die anders gerichteten und erst im folgenden besprochenen Nr. 20 u. 21) Stielstummel von 1 cm Länge stehen. *Molisch* entfernte die Stiele schon zu Versuchsbeginn vollständig.

Nach den Werten unseres Versuches 19 scheint es, als ob die Hexosenmenge beim Fehlen der Stärke auf Kosten des Rohrzuckers zunehmen könne. Darüber sind weitere Versuche geplant, mit der Fragestellung, ob an etwas wie einen funktionellen Ersatz des Rohrzuckers durch Hexosen zu denken sei.

V. Blattstiele.

Mit *Blattstielen* haben wir bisher nur einen Vorversuch angestellt. Es wurden jeweils 10 Stiele verwendet, diese blieben während des Versuches in Verbindung mit der Lamina, wurden erst danach abgeschnitten und für sich analysiert. Es wurde lediglich das Reduktionsvermögen direkt und nach Inversion mit $^{n}/_{1}$-Salzsäure bestimmt, daher müssen wir die Wiedergabe etwas anders gestalten als bei den vorausgehenden Versuchen[1]). Wir geben zuerst die unmittelbaren Analysenzahlen:

Versuch 20 (21. VII. 1921): Ernte 4h nachmittags. *Blattstiele.*

	Extraktmenge ccm	mg Cu in 20 ccm Extrakt		Differenz	Trockengewicht
		direkt	nach HCl-Behandlung		
A. Sofort nach Ernte analysiert	100	30,05	41	10,95	231
B. In Verbindung mit der Lamina 18 Stunden trocken, dann analysiert	104	42,75	55,85	13,1	287
C. Nach der Ernte 18 Stunden die Stiele untergetaucht, die Spreiten schwimmend dann analysiert.	108	33.65	39,8	6,15	234
D. Nach der Ernte 18 Stunden die Stiele im Wasser, die Spreiten frei an der Luft, dann analysiert*)	110	29,25	34,35	5,1	230

*) In dieser Serie enthielt das Wasser 6 mg, oder, bezogen auf 1000 Teile Trockensubstanz der Stiele 27,4 Teile Gesamtzucker (berechnet aus Cu-Reduktion nach Salzsäurehydrolyse).

Um die Werte vergleichbar zu machen, haben wir auf gleiche Flüssigkeitsmengen reduziert. Wäre jede Serie mit so viel Wasser behandelt worden, daß sie 100 ccm Extrakt geliefert hätte, so hätte dies für 20 ccm des Extraktes folgende Kupfermengen in Milligramm ergeben:

	A.	B.	C.	D.
Direkte Reduktion	30,05	44,5	36.3	32,1
Nach Inversion mit Salzsäure.	41	58.1	43	37.8
Differenz.	9	13,6	6,7	5,6

[1]) Eine Rechnungsführung wie in den Versuchen 17—19 ist im obenstehenden wegen des hohen Gehaltes an direkt reduzierenden Zuckern unmöglich.

Bezogen nunmehr auf gleiches Trockengewicht erhält man die folgenden nur innerhalb des Versuches und da nicht uneingeschränkt vergleichbaren Relativwerte:

	A.	B.	C.	D.
Direkte Reduktion	130	155	155	140
Nach Salzsäurebehandlung . .	173	202	184	164
Differenz.	43	47	29	24

Es wächst also in den Stielen abgeschnittener Blätter im Dunkeln wie bei den Spreiten der Gehalt an direkt reduzierenden Zuckern (Hexosen). Doch war an ihnen ein Unterschied zwischen dem trocken- und dem naßgehaltenen Material nicht wahrzunehmen.

Deutlich tritt bei den ausgiebig mit Wasser versorgten Stielen die Abnahme der nach Inversion reduzierenden Zucker in Erscheinung und zwar sowohl bei denen, deren Spreiten auf Wasser schwammen, als bei denen deren Spreiten frei in die Luft ragten. Nicht einwandfrei bewiesen ist die Zunahme dieser Zucker in den trocken gehaltenen Stielen, wir halten sie indes für wahrscheinlich. Denn die Proportionalitätsrechnung der letzten Tabelle ist als quantitativer Maßstab für die anwesenden Zuckermengen nicht ganz richtig. Den höheren Werten entsprechen größeren Zuckermengen als sie die gerade Proportion ergibt. Um dies anschaulich zu machen, haben wir unter Vernachlässigung eines möglichen Maltosevorkommens aus den Analysenwerten Hexosen und Rohrzucker berechnet:

	A.	B.	C.	D.*)
Gesamtzucker .	484	561	501	545
Hexosen . . .	361	427	425	381
Rohrzucker . .	120	131	75	57

Alles pro Mille Trockensubstanz.

*) Siehe dazu die Anmerkung hinter Versuch 20 (S. 181).

Nimmt man, was durch unsere sonstigen Versuche einigermaßen begründet erscheint, nur unbedeutende Schwankungen des Maltosegehaltes an, so wären diese Werte um einen ziemlich konstanten Faktor zu hoch, die Differenzen indes reale, wenn auch quantitativ korrekturbedürftig. Man wird also vorbehaltlich einwandfreier Nachprüfung sagen können, daß die Stiele, wie die Spreiten, bei reichlicher Wasserversorgung Rohrzuckerabnahme und bei Wassergehaltsrückgang eine (schwache) Zunahme zeigen.

Weiterhin sollen Stiele untersucht werden, die ohne Verbindung mit den Spreiten dem Versuch unterworfen wurden.

VI. Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse.

Die mitgeteilten, in verschiedenen Punkten zu ergänzenden und sicherzustellenden Versuche ergaben also folgendes:

In dunkel gehaltenen abgeschnittenen Blättern von Tropäolum schwindet beim Welken die Stärke rascher als bei gewahrter Turgescenz. Der Hexosengehalt nimmt zu, und das qualitativ unabhängig vom Wassergehalt. Der Rohrzuckergehalt hingegen steigt bei Gegenwart von Stärke bei fallendem und fällt bei steigendem Wassergehalt. Fehlt Stärke, so unterbleibt die Rohrzuckerbildung, es kann alsdann auch bei Sinken des Wassergehaltes die Menge dieses Zuckers abnehmen, vielleicht zugunsten der Hexosen. Für die Maltose, deren Mengen verhältnismäßig klein blieben, konnte eine Gesetzmäßigkeit nicht festgestellt werden.

Wir machen uns auf Grund dieser Tatsachen vorläufig das folgende Bild des Umsatzes in detachierten Blättern: Qualitativ unabhängig vom Wassergehalt wird Stärke bis zu Hexosen abgebaut, diese stauen sich beim Fehlen der Ableitung an[1]). Daneben wird, wenn der Wassergehalt zurückgeht, auf Kosten vorhandener Stärke — unbekannt auf welchem Wege — Rohrzucker gebildet, vermutlich in Mengen, die durch den gegebenen Wassergehalt vorgeschrieben sind.

Festzustellen bleibt noch, was aus dem bei Vermehrung des Wassergehaltes verschwindenden Rohrzucker wird. Eine Stärkezunahme konnte nicht beobachtet werden, obwohl die Abnahme des Rohrzuckers einen Betrag erreichen konnte, der nach unserer Schätzung als Stärkezunahme mit der *Sachs*schen Jodprobe zu erkennen gewesen wäre. Hier sollen im nächsten Sommer Versuche mit quantitativer Stärkebestimmung einsetzen. Es wäre denkbar, daß der Stärkeabbau zu Hexosen alsdann für einige Zeit stillstände und durch Rohrzuckerhydrolyse ersetzt würde. Vielleicht könnten auch Glykoside in den Umsatz gezogen werden. Aus welchen Gründen und in welchem Sinne dies vorzustellen wäre, soll an anderem Orte behandelt werden.

Mit Hilfe der vorgesehenen quantitativen Stärkebestimmung soll, wenn möglich, ferner untersucht werden, ob die beim Welken verschwindende Stärke — nach Abzug des Atemverlustes — quantitativ als Rohrzucker und Hexosen wiederzufinden ist.

Die Hexosen, an deren Zerlegung wir bisher noch nicht herangegangen sind, die wir daher zunächst als Einheit behandeln müssen, sind bei untertags geernteten und sofort analysierten Blättern bezogen auf das Trockengewicht in den Stielen in 5—6 mal so großer Menge

[1]) Vergleiche dazu Versuch 21 mit Blättern in situ an der Pflanze und die dort, allerdings bei geringem Stärkegehalt, eingetretene ausgiebige Hexosenabnahme.

vorhanden als in den Spreiten (einschließlich der Nerven)[1]). Für einen Wanderungsstoff, dessen Bahn sich im Stiel stark verengt, wlrd man etwas derartiges erwarten können. Für die Erklärung der Mechanik des Wanderns ergibt sich jedoch dabei die Schwierigkeit, daß man eine Bewegung gegen das Konzentrationsgefälle anzunehmen hätte. Ob die beabsichtigte Zerlegung der Hexosen[2]) oder ob Lokalisationsverhältnisse diese beseitigen werden, ist abzuwarten. Denn wir haben in unseren bisherigen Versuchen die Blattspreite schlechthin als homogen behandelt. Es ist jedoch notwendig, zum wenigsten zwischen den Nerven und dem Rest der Lamina zu unterscheiden. Eine versuchte Analyse der stärksten Blattnerven scheiterte, da nicht genug Material in Arbeit genommen war. Diese „Lokalisationsuntersuchungen" sollen im nächsten Sommer ausgeführt werden, unter Einbeziehen mikrochemischer Methoden und der Messung des osmotischen Druckes.

Zu untersuchen bleibt ferner, ob die Hexosen lediglich als Wanderstoffe funktionieren. Aus den letzten Versuchen mit stärkefreien Blättern könnte man vielleicht schließen, daß ein funktioneller Ersatz des Rohrzuckers durch Hexosen vorkomme. Hierzu und für andere Fragen sind Versuche mit Zuckerblättern geplant[3]).

VII. Blätter in Verbindung mit der Pflanze. Verbreitung der Erscheinung.

Dürfen diese Befunde gewonnen an isolierten Blättern auf solche übertragen werden, die mit der Pflanze in natürlichem Zusammenhang stehen? Hierzu haben wir bisher erst einen Versuch angestellt, der unter mehreren Mängeln[4]) litt und darum nicht als entscheidend angesehen werden kann. Immerhin zeigte er keinen Widerspruch gegen unsere Beobachtungen an isolierten Blättern. Wir bringen die Resultate wegen des Fehlens der Citronensäureinversion in der für Versuch 20 befolgten Weise.

[1]) Tropäolum in unseren Versuchen: Spreiten maximal 58 pro Mille der Trockensubstanz, Stiele zwischen 290 und 361 pro Mille.

Bei den Analysen der Stiele fehlt die Citronensäureinversion. Doch wird die Maltosenmenge durch das Resultat der Salzsäureinversion begrenzt. Vorstehende Hexosenzahlen sind derart gewonnen, daß die gesamte Menge des durch Salzsäure hydrolysierbaren Zuckers, einmal als Maltose und einmal als Rohrzucker angesehen wurde. Dadurch erhält man die Grenzwerte für die Hexosen und selbst bei der ungünstigsten Annahme, Zunahme des Inversionsvermögens bei Salzsäurebehandlung allein durch Maltose verursacht, erhält man fünfmal soviel Hexosen im Stiel wie in den Spreiten.

[2]) *Ruhland*, Jahrb. f. wiss. Botan. **50**, 200. 1913, zieht Fructose als vorherrschende Wanderungsform der Kohlenhydrate in Erwägung.

[3]) Einige orientierende Versuche mit Convallaria und Iris ergaben nicht mehr, als daß diese Objekte für die Untersuchung wenig geeignet sind (vgl. *Kylin*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **101**, 77. 1918).

[4]) Geringer Stärkegehalt, Unterlassen der Citronensäurehydrolyse, Verschiedenheiten im Ausgangsmaterial (Trockengewicht von 2 mal 21/2 Blättern der Pflanze A: 1458 mg, von 2 mal 23/2 Blättern der Pflanze B: 2461 mg!).

Versuch 21: 2 Topfexemplare von Tropäolum wurden 30 Stunden nicht begossen, danach, 5h nachmittags, dunkel gestellt, gleichzeitig wurde die eine (A) intensiv bewässert, während die zweite (B) weiter ohne Wasser blieb. Von jeder Pflanze wurden von einigen 20 Blättern die Hälften zu Versuchsbeginn abgeschnitten und analysiert (Kontrollhälften), die anderen nach 40 Stunden Verweilen unter den neuen Bedingungen. Der mediane Nerv, der an letzteren geblieben war, wurde vor der Analyse entfernt.

	Wassergehalt	Extraktmenge ccm	mg Cu für 20 ccm Extrakt direkt	mg Cu für 20 ccm Extrakt nach HCl-Behandlg.	Differenz	Trockengewicht	Stärke
A. I. 21 2 Blätter sofort analysiert	90,3	97	15,7	45,75	30,05	865	wenig
A. II. 21/2 Blätter 40 Stdn. nach intensivem Bewässern analysiert	nicht bestimmt	102	5,5	11	5,5	593	Spuren
B. I. 23 2 Blätter sofort analysiert	88,2	95	22,3	61,25	38,95	1321	Spuren
B. II. 23 2 Blätter nach weiteren 40 Stdn. Trockenstehens analysiert	nicht bestimmt	91	4,2	13,5	9,3	1140	keine

Auf 100 Teile Extrakt gibt dies Milligramm Cu (siehe vorn S. 181):

	A. I.	A. II.	B. I.	B. II.
Bei direkter Reduktion . . .	15,2	5,6	21,2	3,8
Bei Reduktion n. HCl-Inversion	44,4	11,2	58,2	12,3
Differenz.	29,2	5,6	37,0	8,5

Umgerechnet auf gleiche Mengen Trockensubstanz sind dies Milligramm Cu (Relativwerte siehe vorn S. 182). Diese Umrechnung ist bei den großen Unterschieden im Trockengewicht der beiden Serien noch weniger exakt als bei Versuch 20.

	A. I.	A. II.	B. I.	B. II.
Direkte Reduktion	176	94	161	33
Nach HCl-Behandlung	513	190	441	108
Differenz.	337	96	280	75

Oder Unterschied in der Zunahme des Reduktionsvermögens nach Salzsäureinversion: A. I. — A. II. = 241 und B. I. — B. II. = 205.

Nehmen wir unter Vernachlässigung der Maltose, die durch die früher mitgeteilten Versuche zumal bei dem minimalen Stärkegehalt einigermaßen gerechtfertigt wird, nur die Gegenwart von Hexosen und Rohrzucker an, so erhalten wir folgende Zahlen für diese beiden Zucker:

	Wassergehalt	Zucker absolut			Zucker pro Mille			Stärke
		Gesamtzucker	Hexosen	Rohrzucker	Gesamtzucker	Hexosen	Rohrzucker	
A. 21/2. Blätter sofort analysiert . .	90,3	136,9	45,54	85,53	158	53	99	wenig
						−28	−73	
A. 21/2 40 Stdn. nach intensiv. Bewässerung analys. . .	—	31,7	15,09	15,44	53	25	26	Spuren
B. 23/2 sofort analys.	88,2	184,5	65,01	114,24	139	49	87	Spuren
						−39	−64	
B. 23/2 nach 40 Stdn. weiteren Trockenstehens analysiert	—	38,7	11,23	26,14	34	10	23	keine

Die Ergebnisse sind wegen des geringen, in Serie B bei Versuchsabschluß fehlenden Stärkegehaltes mit den vorn beschriebenen Versuchen 17—19 zu vergleichen. Wie dort nahm hier der Rohrzucker bzw. die nach Salzsäureinversion reduzierenden Zucker in beiden Serien ab. Dabei war — wiederum wie in Versuch 17—19 — der Rückgang in den Blättern der trocken gehaltenen Pflanze geringer als in denen der bewässerten. Man kann daher diesen Versuch, allerdings im Hinblick auf die vorn berührten Mängel mit einem gewissen Vorbehalt, für die Annahme verwenden, der Rohrzucker verhalte sich in Blättern in situ an der Pflanze ebenso wie in abgeschnittenen.

Der in beiden Serien gefundene Verlust an Hexosen, direkt reduzierenden Zuckern, wird eine Folge der Ableitung sein. Die Abnahme erreichte in Serie B (trocken) einen höheren Betrag als in Serie A (naß). In Versuch 18 und 19 trat beim Fehlen der Ableitungsmöglichkeit Hexosenzunahme ein. Diese war in den trocken gehaltenen Serien größer als in den turgescenten.

Wir unterlassen weitere Diskussion, da wir, wie gesagt, den Versuch nicht für vollwertig halten und ihn in verschiedenen Modifikationen wiederholen wollen. Wir rechnen dabei im Gedanken an die Untersuchungen *Pringsheims*[1]) über das Verhalten älterer und jüngerer Blätter beim Welken an der Pflanze mit der Möglichkeit von Komplikationen.

Was *die Verbreitung der Erscheinung* anbelangt, so ist das Schwinden der Stärke beim Welken für die Blätter einer größeren Anzahl von Phanerogamen festgestellt (*Neger*, *Molisch*). Für Moose liegen Beobachtungen von *Lundegardh* und unsere eigenen vor. Es handelt sich also um einen verbreiteten Vorgang. Doch fand *Neger*, daß nur krautartige Blätter die Erscheinung zeigen[2]), lederartige, besonders wintergrüne, verhalten sich anders [Evonymus, Efeu, Fuchsia[3])].

[1]) *Pringsheim*, Jahrb. f. wiss. Botan. **43**. 121. 1906.

[2]) *Deleano*, Jahrb. f. wiss. Botan. **51** 541. 1912, berichtet über Versuche mit Weinblättern, unternommen mit ganz anderer Fragestellung, aus welchen wir fast folgern möchten, daß diese zu dem abweichenden Typus gehören.

[3]) Fuchsia übrigens nach *Lundegardh* gerade diejenige unter den von ihm untersuchten höheren Pflanzen (Artangabe fehlt bei ihm wie bei *Neger*), die beim

Wenn nun wirklich hier eine häufiger vorkommende Erscheinung vorliegt, ist zu erwarten, daß die ältere Literatur Versuchsergebnisse enthält, die mit den von uns gefundenen Tatsachen übereinstimmen, wenn sie auch von den betreffenden Experimentatoren anders ausgelegt wurden. Das ist in der Tat der Fall.

Für die von uns betonte Unabhängigkeit des Rohrzuckergehaltes vom Hexosengehalt lassen sich leicht zahlreiche Belege aus der Literatur beibringen. Wir verweisen dafür z. B. auf die bei *Ruhland* wiedergegebenen Tabellen eigener und fremder Resultate[1]) und begnügen uns hier mit der Reproduktion eines Analysenresultates *Girards*[2]) erhalten mit Zuckerrübenblättern.

Datum und Tageszeit der Ernte	24. IX. 4h p. m.	26. IX. 4h a. m.	26. IX. 4h p. m.
Wasser . . . . %	86,24	87,62	85,15
Rohrzucker . . %	1,04	0,6	1,83
Hexosen. . . . %	3,17	2,72	2,66
Teile Rohrzucker auf 100 Teile Hexosen	33	22	68

In diesem Versuch *Girards*, der sich vor seinen übrigen durch besonders sorgfältige Materialauslese auszeichnet, verlaufen die Kurven für Rohrzucker und Wassergehalt, wie in unseren Versuchen, gegensinnig. Die Hexosen lassen eine Beziehung zum Wassergehalt nicht erkennen und ebensowenig verraten Rohrzucker und Hexosengehalt eine solche zueinander.

Girard schließt aus diesen und weiteren Versuchen, die übrigens nicht alle diese Beziehung zwischen Rohrzucker und Wassergehalt erkennen lassen, das Belichtung die Rohrzuckerzunahme bewirke.

Wir wollen deshalb bereits an dieser Stelle einige Worte über den Einfluß der Belichtung einschalten.

Unsere Versuche verliefen alle in der Weise, daß die Blätter zu Versuchsbeginn ins Dunkle gebracht wurden. Die raschere Stärkeabnahme beim Welken und die Unterschiede im Rohrzuckergehalt zwischen unseren trockenen und feuchten Serien sind daher unabhängig

---

Plasmolysieren von Blattquerschnitten für den Stärkeschwund noch die besten Resultate lieferte. *Lundegardh* hat vorwiegend, wenn nicht ausschließlich, wintergrüne (Gewächshaus-)Pflanzen untersucht und unsere Bemerkung, sein Material sei vielleicht ungeeignet gewesen, bezieht sich im Hinblick auf *Negers* Angaben eben auf diese Auswahl.

[1]) *Ruhland*, Jahrb. f. wiss. Botan. **50**, 220/221. 1912. *Lindets* und *Pellets* Arbeiten kennen wir nur daraus.

(Soweit diese Tabellen Glucose und Fructose trennen, lassen sie auch für jede einzelne dieser Hexosen keinerlei quantitative Beziehungen zum Rohrzuckergehalt erkennen.)

[2]) *Girand*, Cpt. rend. **97**, 1305. 1883.

von der Belichtung und, was uns besonders wichtig erscheint, es ist erwiesen, daß der Rohrzucker, sofern Stärke anwesend ist, im Dunkeln zunehmen kann. Wenn also das Licht wirklich eine primäre Wirkung auf den Rohrzuckergehalt äußert, so tritt diese gegenüber dem Einfluß des Wassergehaltes zurück.

Bei der in feuchten wie trockenen Serien gefundenen Hexosenzunahme könnte hingegen neben der durch das Abschneiden veranlaßten Stauung die Verdunklung von Einfluß gewesen sein.

Das behauptete Fehlen eines konstanten Verhältnisses Rohrzucker zu Hexosen zeigte sich bei unseren Versuchen in zu Versuchsbeginn verdunkelten abgeschnittenen Blättern, es gilt indes, wie die in der Literatur mitgeteilten Analysenergebnisse beweisen, gleicherweise für belichtete an der Pflanze belassene Blätter[1]). Es wird also auch hierbei die Gegenwart oder Abwesenheit von Licht keine Rolle spielen.

Schließlich wollen wir an dieser Stelle auf die vorn (S. 166) erwähnten Versuche mit Syringablättern hinweisen, die den Anstoß zu unserer Untersuchung gegeben haben. In diesen beobachtete Frl. *Horn* bei intensiver Besonnung Verschwinden der Stärke in detachierten mit den Stielen in Wasser tauchenden Blättern, wenn Erschlaffen eintrat. Unterblieb das Welken, so enthielt das Blatt bis zuletzt Stärke. Es kann demnach der Stärkeschwund infolge Wasserverlustes bei unterbundener Ableitung sowohl im Lichte wie im Dunkeln eintreten. Und es ist nicht anzunehmen, daß die infolge Verschließens der Spalten — dies geschieht nach *Stahl* bei Syringa — eintretende Sistierung der Kohlensäure Assimilation die einzige oder auch nur die hauptsächlichste Ursache des Stärkeschwundes gewesen sei. Denn dann müßte eben beim Fehlen des Abtransportes alle Stärke verbraucht, veratmet worden sein. Es wird also auch hier im besonnten welkenden Blatt Zucker (Rohrzucker) auf Kosten der Stärke gebildet worden sein[2]).

VIII. Theoretisches und Ausblicke.

Soweit das Tatsächliche! Die Befunde tragen recht weit, was weder *Lundegardh* noch *Neger* oder *Molisch* zu würdigen vermochten, da sie das Verhalten des Rohrzuckers nicht kannten. Ihre Überlegungen sind aus diesem Grunde nicht über das System Stärke Zucker hinausgegangen. Dabei wurde der unbestimmte Begriff „Zucker" meist nicht zerlegt,

---

[1]) Vgl. dazu die folgenden besprochenen Versuche von *Brown* und *Morris*.

[2]) Wir können in dieser vorläufigen Mitteilung nicht auf alle vorliegenden Untersuchungen eingehen, die Beziehungen zu unserem Gegenstand haben oder haben können, und stellen viele für die endgültige Veröffentlichung zurück, so z. B.: *Stahl*, Botan. Ztg. **52**, 117. 1894; *Sachs*, Arbeiten aus dem botan. Institut Würzburg Bd. III, S. 15; *Arno Müller*, Jahrb. f. wiss. Botan. **40**, 476 u. 488. 1907 u. a.

doch wurden, unausgesprochen zwar, aber, wie die angestellten Reaktionen mit Sicherheit erkennen lassen, tatsächlich, allein reduzierende Zucker (Hydrolysenprodukte der Stärke, Wanderungszucker) ins Auge gefaßt. Wir wollen im folgenden an einigen ausgewählten Beispielen die Tragweite unseres Ergebnisses illustrieren, obwohl wir uns bewußt sind, daß unsere Ausführungen reichlich hypothetische Elemente enthalten und stellenweise, zuweilen nicht unerheblich, den Rahmen des experimentell Sichergestellten überschreiten.

Für die Kausalität des Vorganges ist zuerst zu entscheiden, ob die Transpiration, die Veränderung des Wassergehaltes oder schließlich der gegebene höhere oder niedere Wassergehalt der wirksame Faktor sei.

Die Transpiration als solche ist belanglos. Denn *Lundegardh* erzielte Stärkeschwund bei Wasserentzug in hypertonischen Lösungen. Ein mittelbarer Einfluß der Transpiration ist natürlich vorhanden, insofern als bei lebhafter Transpiration und ungenügendem Nachschub der Wassergehalt sinkt.

Die Entscheidung zwischen den beiden verbleibenden Alternativen bietet Schwierigkeiten. Es ist bis jetzt nicht gelungen, Stärkezunahme bei Steigerung des Wassergehaltes zu beobachten. Das läßt sich zugunsten der Vorstellung deuten, daß das Sinken des Wassergehaltes wirksam sei. Beim Rohrzucker hatten wir indes die reversible Abhängigkeit vom Wassergehalt. Man müßte, wenn man an die Änderung als unmittelbar wirksamen Faktor glaubt, annehmen, daß sowohl Sinken wie Steigen des Wassergehaltes sich und zwar in gegensätzlichem Sinne äußerten. Doch scheint uns alsdann der zweite Gedanke, der gegebene hohe oder niedere Wassergehalt sei entscheidend, einleuchtender. *Lundegardh* hat Gewöhnungsversuche angestellt und kommt dabei zu dem Ergebnis, die Gewöhnung, Anpassung an das Medium, sei jedenfalls nicht stark. Dieser geringe Erfolg könnte ein Argument für die Vorstellung liefern, daß der jeweils gegebene Wassergehalt und nicht seine Schwankungen maßgebend seien. Wir halten sie bis jetzt für den Rohrzucker für wahrscheinlicher, während wir für Stärke die Entscheidung offenlassen.

Molisch hat die Vermutung ausgesprochen, eine infolge Abnahme des Wassergehalts eintretende Erhöhung der Enzymkonzentration verursache den beschleunigten Stärkeabbau.

Brown und *Morris*[1]) haben den Diastasegehalt von Tropäolumblättern quantitativ untersucht. Sie fanden für Blätter an der Pflanze Steigerung des Abends oder Nachts (35—70% Zunahme), für abgeschnittene, verdunkelte Blätter beim Trocknen (70% Zunahme) und beim 18stündigen Aufbewahren mit den Stielen in Wasser (118.5% Zunahme). Sie konnten ferner zeigen, daß die Diastasevermehrung ein

[1]) l. c.

regulatorischer Vorgang sei, denn sie unterblieb, wenn Blattstücke im Dunkeln auf Dextroselösung schwammen, trat aber beim Schwimmen auf Wasser ein. Da die beiden englischen Forscher nur an die Wirkung des Lichtes, nicht an die von Schwankungen des Wassergehaltes dachten, sind ihre Versuche mit auf diese gerichteter Fragestellung wieder aufzunehmen. Vorläufig glauben wir nicht an *Molischs* mechanische Erklärung, der überdies die Erkenntnis, daß der Rohrzuckergehalt steigt, Schwierigkeiten bereitet.

Wir sind überhaupt von unserer ersten Meinung, es handele sich um die einfache Verschiebung eines Gleichgewichtes, abgekommen und neigen heute dazu, den Vorgang für einen regulatorisch gelenkten zu halten.

Ein Gleichgewicht wäre doch nur zwischen gelösten Stoffen vorzustellen, in das „Bodenkörper" durch Bildung oder Auflösung einbezogen werden könnten. Es ist jedoch nicht verständlich, inwiefern die ungelöste und als solche unlösliche Stärke an einem derartigen Gleichgewicht direkt teilnehmen könnte. Man müßte dann schon sich der Ansicht von *Davis* und seinen Mitarbeitern[1]) anschließen, die annehmen, daß lösliche, gelöste Stärke in geringen Mengen in den Zellen vorhanden sei. Aber selbst auf dem Boden diesen Gedankens bleibt die Schwierigkeit, daß es sich bei dem Abbau der Stärke um einen durch Enzymtätigkeit bewirkten Vorgang handelt, hervorgerufen durch ein Enzym, das von der Zelle, dem Protoplasten produziert wird. Zudem ist der äußere Umstand der den Stärkeschwund herbeiführt, die Abnahme des Wassergehaltes, ein solcher, daß man rein physikalisch das Gegenteil von dem erwarten sollte, was tatsächlich eintritt.

Das sind summarisch angedeutet die Gründe, die uns dazu veranlassen, den Vorgang vorläufig als einen regulatorischen anzusehen. Wir werden auf diese Fragen eingehender zurückkommen, wenn die begonnene Untersuchung über den Enzymgehalt von Blättern unter wechselnden Außenbedingungen weiter vorgeschritten ist.

Der Rohrzucker der Stärkeblätter kann bei seiner von uns behaupteten und durch eigene wie fremde Versuche belegten Unabhängigkeit vom Hexosengehalt nicht als transitorischer Reservestoff, gebildet bei Hexosenüberschuß angesehen werden. Vielmehr führt die Erkenntnis, daß der Rohrzuckergehalt, solange Stärke vorhanden ist, unabhängig eben von der Menge der Hexosen, abhängig jedoch vom Wassergehalt schwankt, zur Folgerung, daß der Rohrzucker eine selbständigere Funktion im Leben der Zelle zu erfüllen habe, eine Funktion, die mit der Wasserhaltung (wenn auch vielleicht nicht mit dieser allein, darüber ein andermal) irgendwie verknüpft sein dürfte. Und er würde für diese Funktion unter Benutzung vorhandener Stärke unabhängig vom Licht-

[1]) Botan. Zentralbl. **132**, 59/60. 1916.

zutritt gebildet. Damit würde eine zur Zeit bestehende Schwierigkeit beseitigt. Trägt doch die heute von verschiedenen Forschern vertretene Ansicht, der Rohrzucker der Stärkeblätter sei der erste bei der Kohlensäureassimilation auftretende Zucker oder er sei ein Mittelglied zwischen Hexosen und Stärke einigermaßen den Charakter einer Verlegenheitshypothese. Denn sie ist chemisch unwahrscheinlich, unter anderem darum, weil das Rohrzuckermolekül, der in diesem enthaltene Fructoserest, im Stärkemolekül nicht vorgebildet sind[1]).

Rywosch[2]) hat Transpiration und Wassernachschub mit der zentripetalen Ableitung der Kohlenhydrate in Verbindung gebracht und bei stärkerer Transpiration, also steilerem Wassergefälle, schnelleren Stärkeschwund beobachtet. Eine Übertragung dieses Gedankens auf den Stärkeschwund in welkenden isolierten Blättern ist, wie auch *Molisch* ausführt, unmöglich, da bei diesen ein Transpirationsstrom fehlt. Wir glauben vielmehr, daß *Molisch* mit seiner Annahme, bei *Rywoschs* eben erwähnten Versuchen habe der Wassergehaltsrückgang mitgewirkt, zutrifft. Jedenfalls haben wir mehrmals gesehen, daß Blätter in situ an verdunkelten feucht gehaltenen Pflanzen ihre Stärke langsamer verlieren als abgeschnittene welkende.

Doch scheint uns die Möglichkeit zu bestehen, auf Grund unserer Befunde an das Leitungsproblem heranzutreten und *Rywoschs* Gedanken weiter auszubauen, um vielleicht die Schwierigkeit, welche das Vorkommen von Stärkekörnern in den Zellen des Leitungsweges, wenigstens auf dem Boden der Grenzkonzentrationshypothese macht, zu beheben.

Die Erkenntnis, daß der Rohrzuckergehalt unmittelbar, der Stärkegehalt ebenso oder mittelbar von dem Wasserghalt abhängen, eröffnet Ausblicke auf *Stahls* Untersuchungen über Zucker- und Stärkeblätter in ihren Beziehungen zur Mycorrhiza und Wasserversorgung[3]). Wenn man *Stahls* Gedanken, der Rohrzucker wird angehäuft und die Stärkebildung unterbleibt bei Mycorrhiza führenden Pflanzen, um die Transpiration niedrig zu halten, im Sinne unserer Erfahrungen umdeutet, kommt man zu folgender Erklärung. Da bei den Mycorrhiza führenden Pflanzen die Wasserversorgung schwach ist und infolgedessen der Wassergehalt der Blätter niedrig bleibt, tritt Rohrzucker in verhältnismäßig hohen Konzentrationen auf und die Stärkebildung unterbleibt, oder zeigt sich erst relativ spät, also bei hohem Rohrzuckergehalt. Infolgedessen ist die Transpiration gering. (Anderseits kann *Stahls* Gedanke auf unsere Befunde übertragen werden, und man könnte in der auf Kosten der unlöslichen Stärke erfolgenden Anhäufung des Rohrzuckers bei Rückgang des Wassergehalts eine Schutzmaßnahme erblicken.)

---

[1]) Siehe dazu S. 193, Umdeutung einiger Versuche von *Brown* und *Morris*.
[2]) *Rywosch*, Botan. Ztg. **66**, 121. 1908; Zeitschr. f. Botan. **1**, 571. 1909.
[3]) *Stahl*, Jahrb. f. wiss. Botan. **34**, 539. 1900.

Für eine andere Gelegenheit behält sich der eine von uns ferner die Erörterung der möglichen Beziehungen unserer Befunde zu den Erscheinungen (Stärkeschwund) an Blättern von Wintergrünen vor. Doch sei hier ein Versuch von *Lidforss* mit Helodea angezogen, weil dieser für eine submerse Pflanze Stärkeumwandlung bei Wassermangel beweist. Helodea gehört nach *Lidforss* zu den nicht frostharten Submersen, für die es eigentümlich ist ihre Stärke bei Temperaturen in der Nähe des Nullpunktes, sofern sie unter Wasser gehalten werden, nicht umzuwandeln. Bringt man sie aber bei derselben Temperatur (+0°) für einige Zeit in feuchte Luft, so zeigt sich in den Zellen eine Erhöhung der Menge des vorher nur spärlich vorhandenen Zuckers, wenn auch die Zellen danach noch reichlich Stärke führten.

Wir wollen auf diese Gegenstände, besonders *Stahls* Arbeit, erst eingehen, wenn Ergebnisse mit Zuckerblättern vorliegen, und wenn wir bezüglich der Lokalisation der Zucker experimentell weiter gekommen sind. Das gleiche gilt für die Erörterung der sogenannten Grenzkonzentrationshypothese, die uns um deswillen immer unvollkommen erschienen ist, weil sie reichlich summarisch weder den die Grenze bildenden Zucker spezialisieren kann noch die Lokalisationsmöglichkeiten innerhalb der Zelle allseitig beachtet.

Es wird bei derartigen Untersuchungen zwischen physikalischem und physiologischem Wassergehalt zu unterscheiden sein. Ersterer ist der wie üblich gemessene und auf die Trockensubstanz bezogene Wassergehalt, letzteren wollen wir kurzweg, wenn auch nicht ganz richtig, als den Wassergehalt des Protoplasten definieren. Wir sind heute unvermögend, diesen zu bestimmen. Doch zeigt folgende Überlegung, daß beide physikalischer und physiologischer Wassergehalt differieren können. Von 2 Blättern einer Spezies enthalte das eine, gleichgültig aus welcher Ursache, 5% der Trockensubstanz Stärke, das zweite keine Stärke, sondern eine dem angegebenen Stärkegehalt äquivalente größere Menge eines Zuckers. Ergibt die Trockensubstanzbestimmung für beide den gleichen physikalischer Wassergehalt, so wird der physiologische verschieden sein, da der gelöste (lokalisiert gelöste) Zucker die Verteilung des Wassers beeinflussen wird. Einen gewissen Maßstab für den Grad des physiologischen Wassergehaltes dürfte die Kenntnis des Sättigungsdefizites liefern, also die Angabe des Verhältnisses des tatsächlich vorhandenen zum maximal möglichen Wassergehalt. Doch sind im Pflanzenorgan mehrere Mechanismen realisiert, deren Eingreifen es verhindern könnte, daß bei physikalisch maximalem Wassergehalt allemal der Höchstgehalt des physiologischen erreicht würde (z. B. Einfluß des Gegendrucks der elastisch gedehnten Zellwand, Gewebespannung u. a.).

[1]) *Lidforss*, Die wintergrüne Flora. Lunds Univers. Arsskrift, N. F. 2. Afd. 2. Nr. 13, S. 46.

Für die Deutung älterer Versuche und für die Methodik künftiger ist unser Ergebnis von Bedeutung. Man hat bei quantitativen Kohlenhydratbestimmungen, sofern allgemeinere Schlüsse daraus gezogen werden sollen, immer den Wassergehalt zu berücksichtigen. Bekanntlich hat man aus den Mengen der zu verschiedenen Tageszeiten und unter verschiedenen experimentellen Bedingungen gefundenen Zucker auf die Vorgänge bei der Kohlensäureassimilation rückgeschlossen. *Brown* und *Morris* haben den Rohrzucker als ersten bei der Assimilation gebildeten, den Hexosen vorausgehenden Zucker angesprochen.

Die Erfahrung nun, daß der Rohrzuckergehalt eine Funktion des Wassergehaltes sei, legt die Vermutung nahe, daß zum wenigsten einige, wenn nicht alle Versuche dieser Autoren umzudeuten seien. *Brown* und *Morris* fanden bei abgeschnittenen und mit den Stielen in Wasser tauchenden Blättern nach 12stündiger Insolation eine starke Rohrzuckerzunahme:

Tabelle I (nach *Brown* und *Morris*) (day fairly bright and sunny).

	Stärke	Rohrzucker	Hexosen	Maltose
Ernte Vormittag sofort analysiert . .	1,23	4,65	3,96	1,18
Ernte Vormittag nach 12 Stdn. Insolation analysiert	3,91	8,85	7,64	0,69
Ernte Nachmittag sofort analysiert. .	4,59	3,86	0,39	5,33

Ferner war der Rohrzuckergehalt von Blättern in Verbindung mit der Pflanze für des Nachmittags geerntetes Material in der Regel (Ausnahme der vorstehende Versuch) höher als für vormittags eingesammeltes.

Tabelle II (nach *Brown* und *Morris*) (dull morning, day brigth and sunny).

	Stärke	Rohrzucker	Dextrose	Lävulose	Maltose
Ernte 9^h vormittags sofort analysiert	3,24	4,94	0,81	4,78	1,21
Ernte 4^h nachmittags sofort analysiert	4,22	8,02	0,00	1,57	3,62

Schließlich. sank der Rohrzuckergehalt von des Nachmittags geernteten Blättern, wenn diese danach 24 Stunden mit den Stielen in Wasser dunkel gehalten wurden:

Tabelle III (nach *Brown* und *Morris*).

	A. Ernte Nachmittag (fairly sunny day) sofort analysiert	Nach 24 Stdn. im Dunkeln die Stiele in Wasser analysiert	B. Ernte Nachmittag (bright warm day) sofort analysiert	Nach 24 Stdn. im Dunkeln die Stiele in Wasser analysiert
Stärke . . .	3,693	2,980	5,425	0,906
Rohrzucker .	9,98	3,49	7,33	3,35
Dextrose . .	0,00	0,58	0,00	1,34
Lävulose . .	1,41	3,46	2,11	3,76
Maltose . . .	2,25	1,86	2,71	1,28

Alles in Prozent der Trockensubstanz.

Leider haben *Brown* und *Morris* keine Wassergehaltsbestimmungen gemacht[1]), indes hat die Annahme, die Blätter mit höherem Rohrzuckergehalt hätten den niedereren Wassergehalt besessen, wenn man die Erntezeiten und die Behandlung beachtet, durchaus nichts Gezwungenes. Denn es wäre der geringere Wassergehalt vorzusehen für abgeschnittene mit eintauchenden Stielen 12 Stunden besonnte Blätter verglichen mit solchen, die vormittags 9 Uhr geerntet waren (Tabelle I)[2]) oder (Tabelle II), für nachmittags gesammelte Blätter verglichen mit solchen die vormittags geerntet wurden oder schließlich für Blätter, die des Nachmittags geerntet und sofort analysiert wurden verglichen mit solchen, die bei gleichzeitiger Ernte vor der Analyse 24 Stunden im Dunkeln die Stiele in Wasser verweilten[3]).

Das erscheint durchaus wahrscheinlich. Allerdings setzen wir dabei für einen Teil der Versuche wiederum voraus, daß die von uns gefundene Regel auf Blätter in natürlicher Verbindung mit der Pflanze zu übertragen sei. Wir haben unsere Gründe dafür vorn auseinandergesetzt. Wir nehmen weiterhin an, daß der Wassergehalt der Blätter einer intakten Pflanze unter natürlichen Bedingungen Schwankungen unterliege. Diese werden sich im allgemeinen mit der mehrere vorbereitende Operationen erfordernde und Materialzerstörung verlangenden gewichtsanalytischen Methode[4]) nur mühsam verfolgen lassen. Indes beweisen die Schrumpfungsmessungen, die *Thoday*[5]) vornehmlich an Helianthusblättern vorgenommen hat, daß sich der Wassergehalt der Blätter an der Pflanze beständig ändert und daß schon Minuten währende Beschattung durch Wolken eine deutlich erkennbare Wirkung äußert. Untertags trat Arealverminderung (Schrumpfung) ein, nicht nur an sonnigen Tagen, sondern auch an einem wolkigen mit gelegentlichen Sonnenblicken. Zu untersuchen bleibt uns noch, ob diese Schwankungen eine Höhe erreichen, die genügt, die gefundenen Unterschiede im Rohrzuckergehalt restlos zu erklären.

[1]) Ihre wohlbegründete Methodik (rasches Trocknen im Ofen) hätte diese nur für Parallelkontrollen erlaubt.

[2]) Vgl. dazu *Thoday*, Proc. of the roy. soc. of Lnodon, Series B **82**, 35. 1910. Abschneiden der Stiele unter Wasser genügt allein nicht, besonnte detachierte Blätter bei voller Turgescenz zu erhalten, wenn nicht die Ernte ganz früh am Tage bei möglichst schwacher Transpiration erfolgt.

[3]) Alle Versuche von *Brown* und *Morris* zusammengefaßt ergaben für Vormittagsernten 4,65 und 3,24% Rohrzuckergehalt, für Nachmittagsernten 3,96, 8,02, 9,98 und 7,33%, also mit der einen oben vermerkten Ausnahme einen starken Ausschlag zugunsten des Nachmittags. Die Ausnahme kann eine sekundäre Ursache haben. Zu beachten ist, daß *Brown* und *Morris* entsprechend dem Ziel ihrer Versuche sonnige Tage zur Anstellung wählten.

[4]) Die Bezugsgröße, Trockensubstanz, wird infolge der Assimilation und Ableitung gleichfalls dauernd verändert.

[5]) *Thoday*, Proc. of the roy. soc. of London, Series B **82**. 1910, besonders die Kurve S. 28.

Es erscheint somit unsere Auslegung der Versuche von *Brown* und *Morris*, der Wassergehalt und nicht das Stattfinden oder Fehlen der Belichtung habe den Rohrzuckergehalt beherrscht, einigermaßen begründet und wenn dies auch noch fester geschehen soll, so ist sie nach unserer Meinung der von den beiden englischen Forschern gegebenen Deutung schon heute entschieden überlegen. Denn wenn diese schließen, Rohrzucker entstehe bei der Assimilation als erster Zucker den Hexosen vorausgehend, er habe den Charakter eines rasch mobilisierbaren Reservestoffes und sowie seine Konzentration in Saft und Plasma eine gewisse Höhe erreicht habe, trete Stärkebildung ein, so widersprechen dem ihre eigenen Befunde. Denn in dem Tabelle I (S. 193) wiederabgedruckten Versuch haben die abgeschnittenen isolierten Blätter höheren Rohrzucker aber geringeren Stärkegehalt als die an der Pflanze belassenen, die weniger Rohrzucker aber mehr Stärke und mehr Maltose enthalten. Des weiteren hat in demselben Versuch die Vormittagsernte mehr Rohrzucker (ausnahmsweise) und weniger Stärke (und weniger Maltose) als die Nachmittagsernte. Während also die Rohrzuckermenge abnahm, stieg der Stärkegehalt. Die Kurven für beide Stoffe zeigen also hier, wie in unseren Versuchen, einen gegensinnigen Verlauf.

Ferner führen wir gegen die Auslegung von *Brown* und *Morris* das bestimmte Ergebnis unserer Versuche an, dahingehend, daß der Rohrzuckergehalt bei Abwesenheit von Licht steigen kann und dies in detachierten, stärkeführenden Blättern immer tut, wenn der Wassergehalt sinkt. Es besteht mithin kein notwendiger Zusammenhang zwischen Rohrzuckerzunahme und Belichtung.

Wenn wir diese Erwägungen überblicken, halten wir uns beinahe für berechtigt, die in unserem Sinne umgedeuteten Resultate von *Brown* und *Morris* als weitere Stütze für unsere Vorstellung zu bezeichnen, die an isolierten Blättern gefundenen gesetzmäßigen Beziehungen zwischen Rohrzucker und Wassergehalt gelten auch für Blätter der intakten Pflanze. Jedenfalls können sie aber als Beleg für die gegenseitige Unabhängigkeit des Hexosen- und Rohrzuckergehaltes dienen.

Gast[1]) hat durchweg des Nachmittags für Tropäolum höheren Rohrzuckergehalt als früh am Morgen, was mit *Brown* und *Morris* übereinstimmt und wie deren Befunde zu erklären wäre[2]).

Wir wollen diesmal schließen und bemerken noch, daß vielleicht die bestehenden Widersprüche über Vorkommen oder Fehlen von Rohrzucker in Blättern sich auf Grund unserer Befunde erklären lassen und daß sich für die Methodik Vorsicht beim Trocknen des Versuchsmaterials empfiehlt.

---

[1]) l. c.

[2]) Die Arbeiten von *Davis* kennen wir nur aus kurzen Referaten (Botan. Zentralbl. **132**, 58—60. 1916. Soweit wir dies danach beurteilen können, widerspricht ihr Befund (Steigerung des Rohrzuckers der Temperaturkurve folgend) unseren Anschauungen nicht.

Endlich nehmen wir Reservestoffbehälter und die Schließzellen der Spaltöffnungen ausdrücklich von unseren Folgerungen aus. Ihr wohl abweichendes Verhalten verlangt eigene Untersuchung[1]).

Die vorliegende Mitteilung ist als eine durch den eingangs erwähnten Umstand veranlaßte vorläufige anzusehen. Infolgedessen sind verbesserungsbedürftige Versuche mit aufgenommen worden und ist manches nachzuprüfen, weiterhin hätte an mehreren Stellen die Erörterung des „Für und Wider" erschöpfender sein können. Wir behalten uns dies und die Besprechung der gesamten Literatur für später vor.

Für bewiesen halten wir folgendes:

1. In den abgeschnittenen Blättern einer größeren Anzahl von Pflanzen schwindet die Stärke beim Welken bedeutend rascher als bei erhaltener Turgescenz. Der Stärkeschwund beim Welken kann sogar bei Besonnung eintreten.

2. In verdunkelten detachierten Tropäolumblättern steigt, falls Stärke anwesend ist, der Rohrzuckergehalt bei fallendem und fällt bei steigendem Wassergehalt oder er ist groß bei geringem und klein bei hohem Wassergehalt. Dieser Vorgang vollzieht sich unabhängig vom Lichtzutritt.

3. Der Rohrzuckergehalt ist unabhängig vom Hexosengehalt, wenn diese, Glucose + Fructose, als eine Einheit genommen werden.

Für wahrscheinlich halten wir auf Grund unserer bisherigen Versuche und Erwägungen:

4. Daß diese Regeln gleicherweise für Blätter in situ an der Pflanze gelten und

5. daß Blattstiele bezüglich des Rohrzuckers das gleiche Verhalten zeigen.

Daraus folgt:

1. Daß der Rohrzucker in Stärkeblättern nicht ein bei Hexosenüberschuß gebildeter transitorischer Reservestoff ist;

2. daß die Deutung der Versuche, auf Grund deren der Rohrzucker als der Stärke vorausgehendes Assimilationsprodukt angesehen wird, revisionsbedürftig ist, weil der seither unbekannte Einfluß von Schwankungen des Wassergehaltes auf die Rohrzuckermenge nicht beachtet wurde.

Wahrscheinlich dürfte dem Rohrzucker, der im Dunkeln zunehmen kann, diese Rolle nicht zukommen, sondern er wird für die Wasserhaltung von Zellen und Organen, vielleicht in weitem Umfang, von Bedeutung sein.

Mit der gewonnenen Erkenntnis, daß der Wassergehalt den Stärke- und den Rohrzuckergehalt der Blätter so weitgehend beeinflußt, ist abgesehen von jeder theoretischen Deutung ein neuer das gegenseitige Mengenverhältnis der Kohlenhydrate mitbestimmender Faktor eingeführt, dessen mögliche Einwirkung bei einschlägigen Untersuchungen nicht unbeachtet bleiben darf.

---

[1]) Vgl. *Renner*, Referat über *Wiggans*, Zeitschr. f. Botan. **13**, 601. 1921.

Zum Schluß bittet der eine von uns ihm und seinen Schülern den Ausbau des durch die vorstehende Mitteilung umrissenen Gebietes für einige Zeit vorzubehalten.

Anhang: Einige Bemerkungen zur Methodik.

Bei Arbeiten wie der vorstehenden ist die Beschreibung der Methodik notwendig, denn sie allein ermöglicht ein Urteil, inwieweit die Ergebnisse zuverlässig sind. Wir sehen uns daher veranlaßt, selbst einer vorläufigen Mitteilung einige diesbezügliche Bemerkungen anzuhängen.

Die mit der Schere fein geschnittenen Blätter wurden jedesmal nach 5 Minuten langem Aufkochen unter Zusatz von etwas Bariumcarbonat (Säureneutralisation) 3 mal mit Wasser extrahiert, und zwar $^1/_2$ Stunde lang, über Nacht und wieder $^1/_2$ Stunde. Die vereinigten Extrakte fällten wir mit Bleiessig, filtrierten und entfernten das überschüssige Blei mit Natriumsulfat, alles unter tunlichster Vermeidung von Überschüssen. Im Filtrat von Bleisulfat wurden die Zucker nach *Bertrands* Verfahren bestimmt, I. unmittelbar, II. nach 20 Minuten Behandlung mit 4 proz. Citronensäure *im* kochenden Wasserbad und nachfolgender Neutralisation mit konzentrierter Sodalösung, III. nach $^1/_2$stündigem Digerieren mit $^n/_1$-Salzsäure gleichfalls *im* kochenden Wasserbad[1]), Neutralisation wie vorstehend. Daraus erhalten wir zuerst (III.) den Gesamtzucker; er wurde als Invertzucker berechnet. Dann wurde aus der Differenz III—II der Maltosegehalt geschätzt; und auf Grund dieser Schätzung, gleichfalls provisorisch, berechnet, welcher Anteil der direkten Kupferreduktion auf Maltose, welcher auf Hexosen entfalle. Damit war der Hexosengehalt näherungsweise bekannt und die Möglichkeit einer genaueren Berechnung gegeben. Diese wurde nun in folgender Weise durchgeführt. Nach Behandlung mit Citronensäure steigt das Reduktionsvermögen für Hexosen von x mg Cu auf y mg Cu, der erste Wert entspricht nach *Bertrands* Tabelle m, der zweite n mg Invertzucker. Subtraktion (n—m) ergibt also die Quantität des aus Rohrzucker entstandenen Invertzuckers, und diese multipliziert mit 0,95 die Rohrzuckermenge. Nach Salzsäurehydrolyse wurden z mg Kupfer gefunden, also bewirkte die Maltosespaltung ein Steigen von y mg Cu auf z mg Cu. Es wurden nunmehr aus der Tabelle die beiden Werten entsprechenden Glucosemengen abgelesen und durch Subtraktion dieser (nicht durch Subtraktion der Cu-Werte) die aus Maltose gebildete Glucose bestimmt.

Diese etwas umständliche Berechnung wurde eingeführt, weil die pro Milligramm Glucose bzw. Invertzucker reduzierte Kupfermenge

[1]) Es wurde also bei II. und III. berechnete Mengen einer erheblich höher konzentrierten Säure zugefügt, so daß die resultierenden Mischungen die angegebenen Säurekonzentrationen besaßen.

mit steigendem Zuckergehalt abnimmt. Das Aufsuchen der Zuckermenge, die der Differenz der Kupferwerte entsprochen hätte, in der Tabelle, hätte daher zu Fehlern geführt. Außerdem wurde bei diesem Vorgehen das Heruntergehen unter die Grenze der Tabelle vermieden.

Alle Fehlerquellen sind damit nicht verstopft; dies ist beim heutigen Stand der Methodik der quantitativen Analyse von Zuckergemischen überhaupt unmöglich. So wurden die Invertzuckerwerte für die primär vorhandenen Hexosengemische genommen, dieses Vorgehen birgt die Möglichkeit eines Fehlers. Derselbe ist indes auf alle Fälle minimal, denn Glucose und Invertzucker unterscheiden sich, wie ein Vergleichen der Tabellen *Bertrands* beweist, in ihrem Reduktionsvermögen nur sehr wenig. Außerdem mußte der Fehler, bewirkt durch den Einfluß einer Zuckerart auf das Reduktionsvermögen einer anderen, vernachlässigt werden, auch ist das Inversionsverfahren mit Citronensäure nicht ganz streng spezifisch. Doch ergaben Kontrollanalysen mit gelösten Zuckergemischen bekannten Einzelgehaltes befriedigende Übereinstimmung zwischen vorhandenen und gefundenen Mengen. Dies gilt indes zunächst nur für das in dieser Kontrolle angewandte Mischungsverhältnis.

Des weiteren wird durch den Bleiessig etwas Zucker entfernt. In Kontrollen — empirisch hergestellte Zuckerlösungen (Rohrzucker + Glucose) — betrug die Abnahme etwa für Glucose 4,1% und für Rohrzucker 3,5%. Bei der Behandlung der Extrakte mag der Fehler, wenn man den voluminösen Niederschlag berücksichtigt, größer gewesen sein. Schließlich muß auch mit der Möglichkeit einer Gegenwart sonstiger kupferreduzierender Stoffe gerechnet werden.

Zuweilen, wenn der Hexosengehalt des Materials niedrig war, blieben die gefundenen Kupfermengen unterhalb des Bereichs der Tabellen *Bertrands*. Alsdann mußte die Zuckermenge auf dem Wege der Extrapolation geschätzt werden, was ungenau ist.

Die gebrachten Werte sind also unzweifelhaft einer Korrektur bedürftig. Die Resultate als solche bestehen gleichwohl zu Recht. Denn die Versuche wurden durchgängig vergleichend geführt. Bei derartigem Vorgehen gefundene Unterschiede können nicht durch obige Fehlerquellen vorgetäuscht werden, sondern sind reale.

Wir glauben aber weiterhin an eine gewisse Konstanz dieser Fehler und sind daher der Ansicht, daß die Größe der gefundenen Ausschläge als ein wenn auch nicht bis aufs letzte genaue, so doch in ziemlicher Annäherung zutreffender Maßstab für den Verlauf des wirklichen Geschehens gelten darf.

Die Wassergehaltsbestimmung[1]) soll in Zukunft dadurch verbessert werden, daß mit oder ohne Aufgeben des bisherigen Verfahrens dazu gleichbehandelte, nicht extrahierte Blätter herangezogen werden.

[1]) Vgl. S. 169, Fußnote 4.

Über die Beziehungen der Vitaminfunktion zum Kalkstoffwechsel.

Von

K. Miyadera.

(Aus der Experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität in Berlin.)

(Eingegangen am 11. März 1922.)

Die Beziehungen der Vitaminfunktion zum Kalkstoffwechsel werden in der neueren Literatur vielfach diskutiert. Diese Erörterungen schließen an die experimentelle Beobachtung von *E.* und *M. Mellanby*[1]) an, nach der junge Hunde, in deren Nahrung der lipoidlösliche Faktor A der Vitaminsubstanzen fehlt, Knochenveränderungen bekommen, die in gewisser Hinsicht denjenigen bei der echten Rachitis ähnlich sind. Man hat eine wesentliche Störung bei der Rachitis darin erblickt, daß im rachitischen Körper das Knorpel- und Bindegewebe die Fähigkeit verloren habe, trotz reichlichen Kalkangebotes den Kalk zu binden, und hat dann die Vermutung ausgesprochen, daß Vitamine dieses Kalkbindungsvermögen der Gewebe bewirkten.

Ob damit die ganze Pathogenese der Rachitis erklärt wird, soll hier nicht untersucht werden. Es ist sogar aus gewissen, hier nicht zu erörternden Gründen unwahrscheinlich, daß die Rachitis nur durch Vitaminmangel und durch nichts anderes zustande kommen könne. Man muß auch immer wieder daran erinnern, daß aus dem Nachweis einer Ursache für eine Störung noch nicht folgt, daß diese Ursache auch die überhaupt allein in Frage kommende sei, und daß nicht auch andere Ursachen das gleiche Phänomen hervorrufen können.

Auf der anderen Seite liegen aber doch Beobachtungen an rachitischen Kindern vor, aus denen sich ergibt, daß Zulage von Vitamin zu der Nahrung in manchen Fällen eine Besserung des Kalkansatzes erzielt. Ich erinnere an die Arbeit von *Freise* und *Rupprecht*[2]), die durch die Gabe von rohem Mohrrübensaft eine Beeinflussung des Kalkstoffwechsels bei rachitischen Kindern erzeugten, und auch *Hamburger* und *Stransky*[3]) machten die Beobachtung, daß Gemüsepulvergaben bei Säuglingen mit beginnender Rachitis eine Besserung der Kalk-

retention hervorriefen, wenn auch das Ergebnis in allen ihren Versuchen nicht ein gleich eindeutiges war, was mir auch auf die Nichteinheitlichkeit der Ätiologie der menschlichen Rachitis hinzudeuten scheint, wie man ja auch experimentelle Rachitis, die bisher niemals mit der spontan entstandenen menschlichen Rachitis ganz identisch war, durch verschiedene Eingriffe erzeugen kann. Auch die Arbeiten von *Schloss* [zit. nach [3])] über den den Kalkansatz befördernden Einfluß des Lebertrans gehören hierher.

Allen diesen klinischen Versuchen an rachitischen Kindern fehlte aber die Voraussetzung, daß die durch Vitaminzufuhr beeinflußbare und auch tatsächlich beeinflußte Stoffwechselstörung auch wirklich durch Vitaminmangel erzeugt worden war. Die Voraussetzung dieser Versuche war eine hypothetische, und die Hypothese dieser Voraussetzung sollte durch das Versuchsergebnis bewiesen werden. Ferner zeigt der rachitische Prozeß selbst während seines Bestehens oft spontane Besserungen, so daß dadurch das Versuchsergebnis in seiner Beweiskraft geschmälert wurde. Aus diesem Grunde schien es mir wünschenswert bei der Wichtigkeit, die die ganze Frage nach der Bedeutung der Vitamine für den Kalkstoffwechsel hat, einmal unter ganz einwandsfreien Versuchsbedingungen diese Frage zu prüfen.

Ich habe daher auf Veranlassung von Herrn Professor *Bickel* das Studium dieser Frage aufgenommen und nach folgender Versuchsanordnung ihre Lösung erstrebt.

2 Hunde wurden ca. 6 Wochen lang mit einer sicher vitaminfreien Nahrung ernährt. In dem ersteren Falle bekam das Tier in dieser Vorversuchszeit eine tägliche CaO-Menge von 0,7 g, in dem zweiten Falle zunächst 3 Wochen von 0,57 und 3 weitere Wochen von 2,3 g.

Als die Stoffwechseluntersuchung begonnen wurde, war der Körper beider Tiere sicher sehr arm an Vitamin. Das beweisen die Versuche von *Tsuji*[4]) und die Versuche von *Suzuki*, *Shimamura* und *Odake*[5]). Die außerordentlich starke Kalkernährung bei dem zweiten Hunde wurde deshalb vorgenommen, um den Einwand ganz sicher ausschließen zu können, daß das Tier etwa in die eigentliche Versuchsperiode mit einem Kalkdefizit infolge zu geringer Kalkmenge der Nahrung in der Vorversuchszeit eingetreten wäre.

Der erste Hund hatte bei Eintritt in die eigentliche Stoffwechselversuchsperiode eine positive Kalkbilanz von +0,278 g CaO täglich. Der zweite, so stark mit Kalk gefütterte Hund wies zu dieser Zeit eine negative Bilanz von —0,614 g CaO täglich auf. Die ganzen Versuche wurden bei Stickstoffgleichgewicht der Tiere durchgeführt. In der Vorversuchszeit hatte das Körpergewicht der Tiere trotz calorisch suffizienter Nahrung abgenommen.

Versuch 1.

In der I. Periode (6 Tage) bekam das Tier lediglich die vitaminfreie Nahrung der Vorversuchszeit mit 0,7 g CaO täglich. Die Kalkbilanz betrug + 0,27895 g CaO.

In der II. Perode (10 Tage) erhielt das Tier zu der vitaminfreien Nahrung der I. Periode eine Zulage von Kalzan, die 0,84 g CaO entsprach, so daß der ganze Nahrungskalk täglich 1,54 g CaO betrug. Die Kalkbilanz hatte den Wert von + 0,35 g CaO.

In der III. Periode (9 Tage) erhielt das Tier dieselbe Nahrung der Vorversuchszeit, nur mit dem Unterschied, daß das vitaminfreie Schweineschmalz durch vitaminhaltige Butter und das vitaminfreie, getrocknete Getreide durch die auf trockenes Getreide berechnete, gleiche Menge an gekeimtem Getreide ersetzt war. Eine Kalzanzulage wurde nicht gegeben. Der Nahrungskalk betrug 0,60 g CaO täglich, die Kalkbilanz + 0,11 g CaO.

In der IV. Periode (9 Tage) bekam das Tier das vitaminhaltige Futter der III. Periode und außerdem eine Zulage von Kalzan in der Höhe von 0,84 g CaO täglich. Der gesamte Nahrungskalk betrug also 1,44 g CaO täglich. Die Kalkbilanz hatte den Wert von + 0,59 g CaO täglich.

In der V. Periode (12 Tage) wurde nur das vitaminreiche Futter der III. Periode mit 0,60 g CaO täglich gegeben. Der Wert der Kalkbilanz betrug in den ersten 6 Tagen dieser Periode + 0,26 g CaO, in den zweiten 6 Tagen + 0,23 g CaO.

In der VI. Periode (6 Tage) wurde wieder mit dem vitaminreichen Futter der III. Periode nebst 0,60 g CaO eine Kalzanzulage von 0,84 g CaO verabreicht, so daß der tägliche Nahrungskalk 1,44 g CaO betrug. Die Kalkbilanz war + 0,52 g CaO täglich.

Aus diesem ganzen, 52 Tage währenden Stoffwechselversuche, bei dem täglich N und CaO im Harn und periodenweise N und CaO im Kot bestimmt wurden, geht mit aller Deutlichkeit hervor, daß auch eine lange Vorausfütterung mit vitaminfreier Nahrung von mäßigem Kalkgehalt nicht notwendig zu einer negativen Kalkbilanz führen muß (I. Periode), daß sogar eine Kalkzulage zu der vitaminfreien Nahrung mit dem niedrigen Kalkgehalt eine leichte Kalkretention bewirken kann (II. Periode mit Kalzan), daß aber erst durch die Umwandlung der vitaminfreien Nahrung in eine vitaminhaltige bei gleichbleibendem Stickstoff-, Calorien- und Kalkgehalt ein stärkerer Kalkansatz bei gesteigertem Kalkangebot zustande kommt (IV. und VI. Periode mit Kalzan), wie er bei der gleichen Kalkzufuhr in der vitaminfreien Periode nicht erzielt werden konnte.

Der in der IV. Periode (Vitamin- und Kalkzulage) retinierte Kalk ist auch in der sehr langen V. Periode nicht wieder ausgeschieden

worden, denn die Kalkbilanz näherte sich hier sofort den niedrigen Werten der I., II. und III. Periode. Ferner ist die Übereinstimmung der Kalkbilanz in den beiden Vitamin-Kalzanperioden mit + 0.59 und + 0,52 g CaO täglich eine ganz außerordentliche, so daß an dem Ergebnis dieses Versuches kein Zweifel sein kann: es wird durch das Vitamin der Kalkansatz befördert, wenn der mit geringen Kalkmengen ernährte Körper eine stärkere Kalkzulage erhält, also wenn überhaupt genügende Kalkmengen zum Ansatz vorhanden sind.

Aus der Beobachtung aber, daß auch Kalzan schon ohne Vitamin, wenn auch in sehr geringem Umfange, retiniert wurde, ergibt sich, daß die Anwesenheit des Vitamins nicht die einzige Voraussetzung für den Kalkansatz ist; aber die Analysen der Perioden, in denen Vitamin gegeben wurde, zeigen doch auch, daß das Vitamin eine sehr wesentliche Rolle bei der Kalkassimilation spielt, indem es den Kalkansatz erheblich befördert.

Versuch 2.

Es wurde oben schon dargelegt, warum bei diesem zweiten Versuche das Tier in der Vorversuchszeit eine enorme Menge von Mineralien und auch von Kalk mit der Nahrung erhielt. Diese Überflutung des Darms mit Mineralstoffen hat offenbar die Resorption der mineralischen Bestandteile beeinträchtigt; der Kot des Tieres wies immer einen enormen Mineralgehalt auf; in der Masse der Mineralien verschwanden geradezu die organischen Bestandteile des Kotes. Vielleicht deshalb und jedenfalls trotz dieses außerordentlichen Kalkangebotes trat das Tier in die Periode des eigentlichen Stoffwechselversuches mit einer negativen Kalkbilanz ein.

Durch die Kalzanzulage zu dieser an sich schon so kalkreichen und vitaminfreien Nahrung wurde nur die Negativität der Kalkbilanz etwas vermindert. Dieses Ergebnis geht also prinzipiell konform mit demjenigen der II. Periode des ersten Versuches.

Nun aber bekam der zweite Hund mit der Nahrung in seiner III. Periode das Vitamin der Reiskleie und zwar ohne Kalzanzulage. Die Kalkbilanz wurde sofort positiv. Als aber dann in der IV. Periode durch Kalzanzulage der Kalkgehalt der Nahrung aufs neue exorbitant gesteigert worden war, blieb zwar auch noch zunächst die Kalkbilanz positiv, sank aber dann mehr und mehr und erreichte trotz Kalzan und Reiskleie und in einer späteren Periode trotz der Gabe von Buttervitamin und Kalzan so stark negative Werte, wie sie sie nie gehabt hatte. Das verstärkte in mir den Verdacht, daß durch die Überschwemmung des Darms mit Mineralien eine andere Störung aufgetreten sei, die die erwartete Vitaminwirkung auf die Kalkbilanz nicht zur Anschauung kommen ließ, zumal das Tier auch klinisch Digestionsstörungen zeigte. Aus diesem Grunde wurden in der letzten Periode des Versuches

an diesem zweiten Hunde alle besonderen Mineralzulagen zu der Nahrung mit Ausnahme des Kalzans fortgelassen, und die Nahrung enthielt an Vitamin nur das Buttervitamin. Es war also immer noch ein reichliches Kalkangebot vorhanden geblieben. Sofort stieg der negative Wert der Kalkbilanz von —0,71 g CaO auf +0,17 g CaO täglich an.

So beweist denn dieser zweite Versuch jedenfalls das eine, daß die Zulage von einzelnen Vitaminen (Reiskleie) zu einer vitaminfreien Nahrung genügt, um den Kalkansatz bei einem vitaminfrei ernährten Tiere zu fördern. Es zeigt aber dieser Versuch auch, daß eine allzu große Überschwemmung des Darms mit Kalk und anderen Mineralien den Kalkstoffwechsel so schwer alterieren kann, daß trotz Vitamin keine Kalkassimilation stattfindet.

Im einzelnen verlief der Versuch folgendermaßen:

Der Hund bekam bei vitaminfreier Ernährung zuerst 3 Wochen täglich 0,5736 g CaO, darauf 3 Wochen täglich 2,3344 g CaO. Dann wurde daran anschließend der Stoffwechsel in der ersten Periode (6 Tage) untersucht bei gleichbleibendem Futter mit 2,3344 g CaO täglich. Die tägliche Kalkbilanz war negativ mit durchschnittlich —0,6138 g CaO. Ich habe nun in der folgenden II. Periode (6 Tage) den Kalkvorrat der Nahrung bei sonst gleichbleibendem Futter noch weiter gesteigert durch Zulage von Kalzan, die 0,84 g CaO entsprach. Die negative Kalkbilanz blieb bestehen, verminderte sich allerdings von —0,6138 g auf —0,4273 g CaO pro Tag. Nunmehr habe ich in der III. Periode (6 Tage) das Futter in der Weise geändert, daß ich den Reis zum Teil ersetzte durch Reiskleie und Zucker und zwar derart, daß der gesamte N-Gehalt der Nahrung und ihr Calorienwert unverändert blieb. Jetzt bekam der Hund also nur einen Vitaminfaktor, nämlich den Faktor B mit der Reiskleie. Der Kalkgehalt der Nahrung betrug wieder 2,3284 g CaO täglich, da Kalzan nicht mehr gegeben wurde. Es verwandelte sich in dieser III. Periode die negative Kalkbilanz allmählich in eine positive mit dem Werte von +0,4674 g CaO täglich. In einer nun anschließenden IV. Periode (6 Tage) wurde das die Reiskleie enthaltende Futter weitergegeben mit einer abermaligen Steigerung des Kalkangebotes durch Zulage von Kalzan mit 0,84 g CaO. Die Kalkbilanz blieb zunächst weiter positiv. Dann aber wurde sie gegen Ende dieser Periode negativ und verstärkte sich in ihrem negativen Werte weiter in der nun anschließenden V. Periode (6 Tage), in der das Futter mit Reiskleie weiter verabfolgt wurde. Hier erreichte sie den Wert von —1,2388 g CaO täglich. Jetzt erhielt das Tier in der VI. Periode (6 Tage) das Futter wie in der I. und II. Periode nur mit dem Unterschiede, daß an Stelle des vitaminfreien Schweineschmalzes vitaminhaltige Butter gegeben wurde. Reiskleie bekam das Tier jetzt nicht. Die Nahrung enthielt also nur den Vitaminfaktor A der Butter. Die Kalkbilanz blieb unver-

ändert negativ mit dem Werte —1,1490 g CaO täglich. In einer nun folgenden VII. Periode (5 Tage), in der das Futter mit dem Buttervitamin weitergegeben wurde, erhielt das Tier wieder als Zulage Kalzan mit 0,84 g CaO täglich zu dem anderen Kalk der Nahrung. Die Negativität der Kalkbilanz nahm etwas ab und ging auf —0,7085 g CaO pro Tag zurück.

In der folgenden VIII. Periode (6 Tage) wurde der Kalkgehalt der Nahrung, die derjenigen der VII. Periode entsprach, in der Weise vermindert, daß das Tier nun als Zulage zu dem organischen Nährmaterial nur noch Kalzan mit 0,84 g CaO erhielt. Sofort wurde die Kalkbilanz trotz des stark verminderten Kalkangebotes im Darme mit +0,1675 g CaO pro Tag positiv.

Überblicken wir nun diesen ganzen zweiten Versuch, so geht daraus hervor, daß ein noch so großes Kalkangebot zu keiner positiven Kalkbilanz geführt hat, solange der Körper vitaminfrei ernährt wird. (Beweis: Die 6wöchentliche, kalkreiche Fütterung vor Beginn des Stoffwechselversuches und die negative Kalkbilanz in der I. Periode.) Zweitens ergibt sich aus dem Versuche, daß Zulage von Reiskleie, also der Vitaminfaktor B, trotz der offensichtlich durch den enormen Mineralgehalt der Nahrung ungünstig beeinflußten Kalkresorption einen gewissen, die Kalkretention begünstigenden Einfluß ausgeübt hat. Drittens sehen wir, daß der Vitaminfaktor A der Butter in gleichem Sinne wirkt. Aber auch seine Wirkung kann illusorisch werden, wenn durch zu großen Mineralgehalt des Darminhaltes die Darmfunktion gestört ist, wie wir wohl annehmen müssen. Denn die Gabe der kleineren Kalkmenge mit dem Kalzan allein neben der Butter führte sofort zu der positiven Kalkbilanz, während diese Bilanz bei der Überschwemmung des Darmes mit Kalk trotz der Butterzulage ausblieb.

Ganz allgemein geht aus diesem Versuche hervor, daß offenbar die Resorptionsbedingungen und damit auch die Retentionsbedingungen für den Kalk günstiger sind bei kleinerem aber natürlich immer noch genügenden Kalkgehalt der Nahrung, als bei einer Überschwemmung des Darmes mit Kalk. Darum tritt der die Kalkassimilation begünstigende Einfluß der Vitamine auch nur dann mit aller Deutlichkeit hervor, wenn der Darm nicht mit zu großen Kalkmengen überschwemmt wird.

Dieser ganze zweite Versuch aber würde allein keine ausschlaggebende Bedeutung für die Frage nach der Bedeutung der Vitamine für die Kalkassimilation haben, wenn nicht das Resultat des ersten Versuches dazuträte, aus dem dieser Einfluß zweifellos hervorgeht. Der zweite Versuch aber ergänzt den ersten besonders in der Richtung, daß er zeigt, daß eine noch so lange Fütterung mit größten Kalkmengen bei vitaminfreier Nahrung keinen — oder allgemeiner ausgedrückt — keinen genügenden Kalkansatz bringt. Denn die erste positive Kalk-

bilanz wurde in diesem zweiten Versuche überhaupt erst nach der Zulage der Reiskleie beobachtet; in dem ersten Versuche wurde eine an sich vorhandene Kalkretention verstärkt durch die Zulage aller Vitamine zu der Nahrung.

Man darf sich nun — das geht aus meinen Versuchen, besonders aus dem ersten Versuche, hervor — nicht vorstellen, daß bei vitaminfreier Ernährung eine positive Kalkbilanz ausgeschlossen wäre, sondern die Verhältnisse liegen vielmehr so, daß das Vitamin nur einen die Kalkretention und -assimilation fördernden Einfluß hat.

Meine Beobachtungen über die Beziehungen der Vitaminfunktion zum Kalkstoffwechsel aber bringen an dem Beispiel dieses einen Minerals den Nachweis, daß die *Bickel*sche Theorie der Vitaminfunktion, nach der das Vitamin die Körperzellen erst zur Assimilation der organischen und anorganischen Substanz befähigt, zutreffend ist.

Eine Assimilation in gewissem Umfange ist gewiß auch noch ohne Vitamin möglich, aber sie genügt nicht; und darum verfällt der vitaminfrei ernährte Körper trotz calorisch suffizienter Nahrungsresorption schließlich dem Tode.

Versuchsprotokolle.

I. Versuch. *Tabelle I.*

Nahrungsanalyse.

	N in g	CaO in g
10,0 getr. Pferdefleisch. .	1,1930	0,0374
10,0 Weizen	0,2033	0,0297
10,0 Schweineschmalz . .	—	0,0296
10,0 Butter	—	0,0292
15 Tabl. Kalzan	—	0,8400
1000 ccm Leitungswasser .	—	0,2866

Tabelle II.

Nahrungsmenge.

	I. Futter	II. Futter
getr. Pferdefleisch . .	40,0 g	40,0 g
Weizen	30,0 g	30,0 g*)
Schweineschmalz . . .	40,0 g	—
Butter	—	40,0 g
Kochsalz	1,5 g	1,5 g
Leitungswasser	1200 ccm	840 ccm

*) Gekeimt in 40 ccm des Leitungswassers.

Tabelle III.

Versuchstag	Körpergewicht kg	Harnmenge ccm	Kotmenge g	N im Harn g	N im Kot g	CaO im Harn g	CaO im Kot g	N in der Nahrung g	CaO in der Nahrung g	N-Bilanz	CaO-Bilanz	Bemerkungen
					I. Periode.							
1.	6,550	265						5,3819	0,7010	+1,5466	+0,2789	1. Futter.
2.	6,840	610	20,5	12,0928	1,3620	0,2336	1,1352	5,3819	0,7010	+1,5466	+0,2789	
3.	6,570	260						5,3819	0,7010	+1,5466	+0,2789	
4.	6,550	255						5,3819	0,7010	+1,5466	+0,2789	
5.	6,850	595	40,5	7,0972	2,4596	0,1062	1,0567	5,3819	0,7010	+1,5466	+0,2789	
6.	6,550	345						5,3819	0,7010	+1,5466	+0,2789	

Tabelle III (Fortsetzung).

Versuchstag	Körpergewicht kg	Harnmenge ccm	Kotmenge g	N im Harn g	N im Kot g	CaO im Harn g	CaO im Kot g	N in der Nahrung g	CaO in der Nahrung g	N-Bilanz	CaO-Bilanz	Bemerkungen
						II. Periode.						
7.	6,600	340						5,3819	1,5410	+1,4091	+0,3488	1. Futter mit 15 Tablett. Kalzan.
8.	6,850	590	41,0	8,3049	2,2599	0,2316	3,5669	5,3819	1,5410	+1,4091	+0,3488	
9.	6,800	525						5,3819	1,5410	+1,4091	+0,3488	
10.	6,800	410						5,3819	1,5410	+1,4091	+0,3488	
11.	7,000	460	45,0	10,0654	2,2942	0,2831	2,8501	5,3819	1,5410	+1,4091	+0,3488	
12.	6,950	550						5,3819	1,5410	+1,4091	+0,3488	
13.	6,940	405						5,3819	1,5410	+1,4091	+0,3488	
14.	7,100	620	66,5	14,1678	2,6357	0,3837	4,6053	5,3819	1,5410	+1,4091	+0,3488	
15.	6,940	595						5,3819	1,5410	+1,4091	+0,3488	
16.	7,000	530						5,3819	1,5410	+1,4091	+0,3488	
						III. Periode.						
17.	7,120	565						5,3819	0,5961	+0,6868	+0,1113	2. Futter.
18.	7,000	560	45,0	10,2931	2,4078	0,1132	1,5565	5,3819	0,5961	+0,6868	+0,1113	
19.	7,100	275						5,3819	0,5961	+0,6868	+0,1113	
20.	7,200	405						5,3819	0,5961	+0,6868	+0,1113	
21.	7,100	515	44,0	11,4156	2,4006	0,1782	1,0305	5,3819	0,5961	+0,6868	+0,1113	
22.	7,100	450						5,3819	0,5961	+0,6868	+0,1113	
23.	7,100	430						5,3819	0,5961	+0,6868	+0,1113	
24.	7,150	465	64,0	12,2409	3,4977	0,1324	1,3524	5,3819	0,5961	+0,6868	+0,1113	
25.	7,200	655						5,3819	0,5961	+0,6868	+0,1113	
						IV. Periode.						
26.	7,100	355						5,3819	1,4361	+0,5568	+0,5886	2. Futter mit 15 Tablett. Kalzan.
27.	7,250	670	54,5	11,4755	2,6295	0,20116	2,9541	5,3819	1,4361	+0,5568	+0,5886	
28.	7,200	360						5,3819	1,4361	+0,5568	+0,5886	
29.	7,300	435						5,3819	1,4361	+0,5568	+0,5886	
30.	7,350	730	67,5	12,5017	3,1377	0,1556	1,8670	5,3819	1,4361	+0,5568	+0,5886	
31.	7,350	580						5,3819	1,4361	+0,5568	+0,5886	
32.	7,300	530						5,3819	1,4361	+0,5568	+0,5886	
33.	7,250	645	47,5	11,2757	2,4058	0,2249	2,2246	5,3819	1,4361	+0,5568	+0,5886	
34.	7,400	685						5,3819	1,4361	+0,5568	+0,5886	
						V. Periode.						
35.	7,400	660						5,3819	0,5961	+0,4441	+0,2624	2. Futter.
36.	7,300	545	48,5	12,2260	2,7582	0,1705	0,8683	5,3819	0,5961	+0,4441	+0,2624	
37.	7,300	590						5,3819	0,5961	+0,4441	+0,2624	
38.	7,400	605						5,3819	0,5961	+0,4441	+0,2624	
39.	7,450	705	39,5	12,3132	2,3294	0,2013	0,7672	5,3819	0,5961	+0,4441	+0,2624	
40.	7,300	580						5,3819	0,5961	+0,4441	+0,2624	
41.	7,370	505						5,3819	0,5961	+0,3935	+0,2254	
42.	7,450	710	42,0	13,3486	2,5030	0,2263	0,8512	5,3819	0,5961	+0,3935	+0,2254	
43.	7,500	565						5,3819	0,5961	+0,3935	+0,2254	
44.	7,250	605						5,3819	0,5961	+0,3935	+0,2254	
45.	7,500	730	47,0	11,2717	2,8069	0,1520	0,9947	5,3819	0,5961	+0,3935	+0,2254	
46.	7,350	490						5,3819	0,5961	+0,3935	+0,2254	
						VI. Periode.						
47.	7,400	705						5,3819	1,4361	+0,8867	+0,5168	2. Futter mit 15 Tablett. Kalzan.
48.	7,350	565	66,5	10,1696	3,0313	0,2293	2,5771	5,3819	1,4361	+0,8867	+0,5168	
49.	7,400	590						5,3819	1,4361	+0,8867	+0,5168	
50.	7,500	540						5,3819	1,4361	+0,8867	+0,5168	
51.	7,500	595	80,0	10,2363	3,5337	0,2551	2,4542	5,3819	1,4361	+0,8867	+0,5168	
52.	7,550	445						5,3819	1,4361	+0,8867	+0,5168	

II. Versuch. *Tabelle IV.*

Nahrungsanalyse.

	N in g	CaO in g
10,0 getr. Pferdefleisch	1,2520	0,0366
10,0 pol. Reis	0,1011	0,0203
10,0 Reiskleie	0,2407	0,0412
10,0 Schweineschmalz	—	0,0302
10,0 Butter	—	0,0114
10,0 Knochenasche	—	1,6530
1,0 Salzgemisch	—	0,0539
15 Tab. Kalzan	—	0,8400
800 ccm Leitungswasser	—	0,2890

Salzgemisch.

Kochsalz	250,0
Calc. lactic.	100,0
Mag. citric.	100,0
Ferrum citric.	25,0
Jod-Jodkalilösung	5,0

Calorienwert.

1,0 Reis	3,996
1,0 Reiskleie	5,050
1,0 Rohrzucker	4,116

Tabelle V.

Nahrungsmenge.

	I. Futter	II. Futter	III. Futter	IV. Futter	V. Futter
getr. Pferdefleisch	35,0 g	35,0 g	35,0 g	35,0 g	35,0 g
polierter Reis	25,0 g	25,0 g	5,0 g	25,0 g	25,0 g
Reiskleie	—	—	8,4 g	—	—
Schweineschmalz	35,0 g	35,0 g	35,0 g	—	—
Butter	—	—	—	35,0 g	35,0 g
Knochenasche	—	10,0 g	10,0 g	10,0 g	—
Salzgemisch	—	2,0 g	2,0 g	2,0 g	—
Zucker	—	—	6,7 g	—	—
Kochsalz	1,5 g	—	—	—	1,5 g
Leitungswasser	800 ccm	800 ccm	800 ccm	800 ccm	800 ccm

Tabelle VI.

Körpergewicht kg	Harnmenge ccm	Kotmenge g	N im Harn g	N im Kot g	CaO im Harn g	CaO im Kot g	N in der Nahrung g	CaO in der Nahrung g	N-Bilanz	CaO-Bilanz	Bemerkungen
					I. Periode.						
5,500	375						4,6347	2,3344	+0,1580	−0,6138	2. Futter.
5,500	175	42,5	11,4170	1,3978	0,0636	9,0289	4,6347	2,3344	+0,1580	−0,6138	
5,500	680						4,6347	2,3344	+0,1580	−0,6138	
5,500	390						4,6347	2,3344	+0,1580	−0,6138	
5,500	445	77,0	11,5598	2,4857	0,0966	8,5003	4,6347	2,3344	+0,1580	−0,6138	
5,500	400						4,6347	2,3344	+0,1580	−0,6138	
					II. Periode.						
5,500	350						4,6347	3,1744	−0,0253	−0,4273	2. Futter mit 15 Tabl. Kalzan.
5,500	485	51,0	12,6854	1,5354	0,1337	10,9388	4,6347	3,1744	−0,0253	−0,4273	
5,500	535						4,6347	3,1744	−0,0253	−0,4273	
5,500	440						4,6347	3,1744	−0,0253	−0,4273	
5,500	420	87,0	10,7072	3,0321	0,1124	11,4261	4,6347	3,1744	−0,0253	−0,4273	
5,500	190						4,6347	3,1744	−0,0253	−0,4273	

Tabelle VI (Fortsetzung).

Versuchstag	Körpergewicht kg	Harnmenge ccm	Kotmenge g	N im Harn g	N im Kot g	CaO im Harn g	CaO im Kot g	N in der Nahrung g	CaO in der Nahrung g	N-Bilanz	CaO-Bilanz	Bemerkungen
III. Periode.												
13.	5,350	400						4,6348	2,3284	+0,1170	−0,4012	3. Futter.
14.	5,450	225	67,0	11,7026	2,8119	0,1308	8,0581	4,6348	2,3284	+0,1170	−0,4012	
15.	5,400	380						4,6348	2,3284	+0,1170	−0,4012	
16.	5,300	455						4,6348	2,3284	+0,1170	+0,4674	
17.	5,350	450	68,0	9,8683	2,7238	0,1364	5,4451	4,6348	2,3284	+0,1170	+0,4674	
18.	5,340	400						4,6348	2,3284	+0,1170	+0,4674	
IV. Periode.												
19.	5,400	395						4,6348	3,1684	−0,1090	+0,3427	3. Futter mit 15 Tabl. Kalzan.
20.	5,320	375	89,0	11,0683	3,2431	0,2111	8,2659	4,6348	3,1684	−0,1090	+0,3427	
21.	5,270	435						4,6348	3,1684	−0,1090	+0,3427	
22.	5,270	325						4,6348	3,1684	−0,1090	−0,9596	
23.	5,250	405	82,5	10,6719	3,4796	0,1978	12,1862	4,6348	3,1684	−0,1090	−0,9596	
24.	5,250	270						4,6348	3,1684	−0,1090	−0,9596	
V. Periode.												
25.	5,300	500						4,6348	2,3284	−0,1302	−1,2388	3. Futter.
26.	5,200	345	77,5	9,9581	2,9936	0,1664	10,7423	4,6348	2,3284	−0,1302	−1,2388	
27.	5,300	380						4,6348	2,3284	−0,1302	−1,2388	
28.	5,250	495						4,6348	2,3284	−0,1302	−1,2388	
29.	5,200	395	78,5	12,1310	3,5073	0,1726	10,3220	4,6348	2,3284	−0,1302	−1,2388	
30.	5,200	365						4,6348	2,3284	−0,1302	−1,2388	
VI. Periode.												
31.	5,200	230						4,6347	2,2686	−0,4737	−1,1490	4. Futter.
32.	5,200	415	74,0	11,6259	2,8705	0,1593	10,0811	4,6347	2,2686	−0,4737	−1,1490	
33.	5,100	360						4,6347	2,2686	−0,4737	−1,1490	
34.	5,220	400						4,6347	2,2686	−0,4737	−1,1490	
35.	5,150	455	67,5	13,2483	2,9055	0,1700	10,0954	4,6347	2,2686	−0,4737	−1,1490	
36.	5,050	255						4,6347	2,2686	−0,4737	−1,1490	
VII. Periode.												
37.	5,200	380						4,6347	3,1086	+0,2691	−0,7085	4. Futter mit 15 Tabl. Kalzan.
38.	5,150	245	81,5	10,3950	2,4721	0,1803	11,3509	4,6347	3,1086	+0,2691	−0,7085	
39.	5,150	250						4,6347	3,1086	+0,2691	−0,7085	
40.	5,220	325	45,0	7,3406	1,6200	0,1167	7,4376	4,6347	3,1086	+0,2691	−0,7085	
41.	5,220	420						4,6347	3,1086	+0,2691	−0,7085	
VIII. Periode.												
42.	5,220	400						4,6347	1,3478	−0,0188	+0,1675	5. Futter mit 15 Tabl. Kalzan.
43.	5,250	490	37,0	11,6789	2,3556	0,1002	3,4408	4,6347	1,3478	−0,0188	+0,1675	
44.	5,300	240						4,6347	1,3478	−0,0188	+0,1675	
45.	5,300	295						4,6347	1,3478	−0,0188	+0,1576	
46.	5,200	460	40,5	11,5029	2,3837	0,1924	3,3781	4,6347	1,3478	−0,0188	+0,1576	
47.	5,300	435						4,6347	1,3478	−0,0188	+0,1576	

Literatur.

[1]) Cf. nach *Boruttau*, Zeitschr. f. physik. u. diätet. Therap. **24**, Bd. **6**. 1920. — [2]) *Freise* und *Rupprecht*, Monatsschr. f. Kinderheilk. **14**, H. 2, S. 115. — [3]) *Hamburger* und *Stransky*, Monatsschr. f. Kinderheilk. 1921, H. 6. — [4]) *Tsuji*, diese Zeitschr. 1922. — [5]) *Suzuki, Shimamura* und *Odake*, diese Zeitschr. **43**, 89. 1912. — [6]) *Bickel*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 4.

Über den respiratorischen Stoffwechsel bei alimentärer Glykämie.

I. Teil.

Von

A. Bornstein und **Kurt Holm.**

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg [Krankenhaus St. Georg].)

(Eingegangen am 13. März 1922.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Vor einiger Zeit war durch Versuche unseres Instituts die Frage behandelt worden, ob bei toxischen Glykämien der den Organen in großer Menge angebotene Zucker auch einer vermehrten Verbrennung unterliege[1]). Das war in manchen Fällen, besonders beim Adrenalin, nicht der Fall, wie Respirationsversuche zeigten. Anders war es bei der Pilocarpinvergiftung, wenngleich auch da ein strenger Parallelismus zwischen Blutzucker und respiratorischem Quotienten (R.-Q.) nicht immer beobachtet werden konnte.

Wenn der durch gewisse Gifte in das Blut geworfene Zucker nicht verbrannt wurde, so lag die Frage nahe, ob denn bei der Glykämie, wie sie durch kohlenhydratreiche Nahrung hervorgerufen wird, der im Blute kreisende Zucker sofort zur Verbrennung gelangt. Daß nach Kohlenhydratnahrung die Zuckerverbrennung ansteigt, ist durch viele Beobachtungen sichergestellt worden. Immerhin war es interessant, nach peroraler Kohlenhydratzufuhr Respirationsversuche und Blutzuckerbestimmungen gleichzeitig anzustellen, um zu sehen, ob dabei vermehrte Verbrennung der Kohlenhydrate der Erhöhung des Blutzuckers parallel geht. In der Literatur haben wir, außer einem grob orientierenden Versuch, den wir (l. c.) publiziert haben, und der naturgemäß die wirklichen Verhältnisse nur sehr unvollkommen wiedergibt, keine exakten Angaben über gleichzeitige Untersuchung dieser beiden Größen finden können.

Eine kurze Angabe von *Reicher* und *Stein*[2]), daß Kohlenhydratgehalt des Blutes und R.-Q. parallel gehen, ist durch eine in Aussicht gestellte ausführliche

[1]) *Bornstein*, diese Zeitschr. **114**, 157. — *Bornstein* und *Müller*, diese Zeitschr. **126**, 64.

[2]) *Reicher* und *Stein*, Kongreß für innere Medizin 1910.

Publikation nicht belegt worden, bei der Art der Kohlenhydratbestimmung im Blute vielleicht auch von zweifelhaftem Werte. *Bernstein* und *Falta*[1]) haben zwar R.-Q. und Blutzucker nach peroraler Kohlenhydratzufuhr in längeren Diskussionen miteinander verglichen, doch haben sie nur den Gaswechsel zu bestimmen versucht und sich im Übrigen mit der aus der Literatur bekannten Tatsache begnügt, daß der Glykosegehalt des Blutes nach peroraler Zufuhr überhaupt erhöht wird, ohne durch Parallelbestimmungen beider Größen zu prüfen, wie sie sich zeitlich zueinander verhalten.

Wie die zahlreichen neueren Versuche am Menschen zeigen, reagieren die einzelnen Individuen verschieden im zeitlichen Ablauf und in der Höhe der Hyperglykämiekurve nach Zufuhr von 100 g Dextrose per os. Die Kurve zeigt auch ein anderes Bild an verschiedenen Tagen bei demselben Individuum. Sicher spielt die zuletzt vorher eingenommene Nahrung dabei eine Rolle, sowie der augenblickliche Ernährungszustand. Ältere Versuche können zum Vergleich nicht herangezogen werden, da bei ihnen die Blutentnahmen zur Zuckerbestimmung durchweg in zu weitem Abstande voneinander erfolgt sind. *Bailey*[2]) fordert deshalb, daß man in der ersten Stunde nach der Dextrosegabe alle Viertelstunden, später alle halben Stunden untersucht, um brauchbare Resultate zu erhalten. Alle einschlägigen Versuche hier aufzuführen, würde zu weit führen. Die Literatur findet sich zusammengestellt bei *Macleod*[3]), *Staub*[4]), *Frank* und *Mehlhorn*[5]). Kurz zusammenfassend soll nur gesagt werden, daß nach peroraler Gabe von Dextrose der Blutzuckeranstieg schon nach 5 Minuten beobachtet worden ist [*Jacobsen*[6])], daß das Maximum nach 20 Minuten bis $1^1/_2$ Stunde erreicht werden kann, und daß die Rückkehr zur Norm, häufig unter den anfänglichen Nüchternwert, nach $2-4^1/_2$ Stunden eintritt.

Was nun die Beobachtung des R.-Q. nach peroraler Dextrosezufuhr betrifft, so sind folgende Daten aus der Literatur für vorliegende Arbeit von Interesse:

Bernstein und *Falta* (l. c.) gaben an, daß bei Glykogenverarmung die Steigerung des R.-Q. ausbleibt. — *Gigon*[7]) zeigte, daß nach einmaliger Gabe von 100 g Dextrose der R.-Q. noch in der 3. Stunde, dann meist sogar am stärksten steigt. Der Beginn der Steigerung findet sich nach den verschiedensten Angaben beim Menschen nie vor Ablauf einer halben Stunde, selbst bei den Versuchen am Kaninchen von *Zuntz* und *Mering*[8]) setzt die Erhöhung erst nach etwa $^3/_4$ Stunden ein.

Im Folgenden werden nun Versuche wiedergegeben, in denen neben fortlaufender Untersuchung des Gaswechsels zahlreiche Blutzuckerbestimmungen, wie sie durch die *Bang*sche Mikromethode leicht möglich sind, vorgenommen wurden. Anfangs wurden die Versuche zum Teil nicht lange genug ausgedehnt, zum Teil auch der Blutzucker nicht häufig genug bestimmt, um den zeitlichen Ablauf der Hyperglykämie mit der Zuckerverbrennung gut vergleichen zu können. Diese Versuche bleiben zunächst außer Betracht und werden weiter unten wegen der bei ihnen vorgenommenen Serumfettbestimmungen kurz erwähnt werden. Im

[1]) *Bernstein* und *Falta*, Arch. f. klin. Med. **125**, 233.
[2]) *Bailey*, Arch. of internal med. **23**, 455. 1919.
[3]) *Macleod*, Physiological Reviews **1**, 208.
[4]) *Staub*, Arch. f. klin. Med. **91**, 44.
[5]) *Frank* und *Mehlhorn*, Jahrb. f. Kinderheilk. **91**, 81.
[6]) *Jacobsen*, diese Zeitschr. **56**, 471.
[7]) *Gigon*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **140**, 509.
[8]) *Zuntz* und *Mering*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **32**. 173.

Übrigen zeigt ein Vergleich der Versuche Nr. 1—11 mit den Versuchen 19—25, wie notwendig rasch aufeinanderfolgende Zuckerbestimmungen für vorliegende Untersuchung sind.

Sämtliche Versuche sind am Schlusse der Arbeit in der Generaltabelle zusammengestellt. Zur Erleichterung der Übersicht beim Lesen sind einige Versuche besonders in Kurvenform dargestellt worden. Die Kurven mußten mit Rücksicht auf die Druckkosten relativ klein gehalten werden, können daher auf sehr große Genauigkeit keinen Anspruch erheben, doch genügen sie wohl dem beabsichtigten Zweck.

Versuche mit vorsätzlicher Muskelruhe und 100 g Dextrose.

Versuch Nr. 1—11 hatten folgende Versuchsanordnung:

Die Versuchsperson war seit dem vorhergehenden Abend nüchtern. Resorbierbare Nahrungsstoffe waren also im Magen-Darmkanal nicht mehr vorhanden und eine Glykogenverarmung lag noch nicht vor. Wurde am Vortage des Versuchs besonders kohlenhydratreiche Kost genommen oder eine vorwiegend Fett-Eiweißdiät innegehalten, so ist dies in der Spalte „Bemerkungen“ bei den Versuchstabellen eingetragen. Die Versuche begannen morgens um etwa 9 Uhr. Die Versuchsperson lag bei vorsätzlicher Muskelruhe auf einem Liegesofa. Der Traubenzucker wurde, in Wasser gelöst, durch ein Rohr im Liegen aufgesogen, so daß Muskelarbeit möglichst vermieden wurde. Die Versuche begannen, nachdem sich die Atmung gleichmäßig eingestellt hatte. Vor der Traubenzuckergabe geschahen 1—2 Nüchternbestimmungen. Es wurde die *Zuntz-Geppert*sche Gasuhr benutzt. Die Blutzuckerbestimmungen (je 4 Parallelbestimmungen) erfolgten nach der *Bang*schen Mikromethode aus dem Capillarblut des Ohrläppchens.

Aus den Versuchsreihen ergibt sich, daß R.-Q. und Blutzuckergehalt nicht parallel gehen. Die Versuche Nr. 1—8 haben das Gemeinsame, daß bei ihnen die Steigerung des R.-Q. der Hyperglykämie in einem bestimmten Zeitabschnitt nachfolgt und zwar hinkt die R.-Q.-Steigerung um etwa $^1/_2$ bis annähernd 2 Stunden nach. Der größte Abstand ist bei Versuch Nr. 6 zu verzeichnen.

Bei den 3 übrigen Versuchen dieser Reihe ist dieses Verhalten der beiden Größen (Blutzucker und R.-Q.) zueinander nicht deutlich, doch sprechen ihre Ergebnisse nicht in gegenteiligem Sinne. Versuch Nr. 9 zeigt einen um etwa 60% steigenden Blutzucker bei einem im Wesentlichen nicht eindeutig beeinflußten R.-Q., während bei Versuch 10 und 11 beide Größen (Blutzucker und R.-Q.) ziemlich gleich bleiben. Jedenfalls läßt sich bei keinem dieser 3 Versuche eine bestimmte Richtung der Bewegung erkennen; ihr Blutzucker und R.-Q. schwanken in mäßigen Grenzen unregelmäßig und unabhängig voneinander auf und ab, abgesehen von einer weiter unten noch zu besprechenden Eigentüm-

lichkeit des R.-Q. Es handelt sich bei diesen 3 im Wesentlichen um Versuche, in denen am Tage vorher Kohlenhydratkost gegeben war und daher entweder der Blutzucker kaum ansteigt oder der R.-Q. von Anfang an hoch ist und nicht weiter steigt.

Der Blutzucker bewegt sich bei den bisher aufgeführten Versuchen in der Hauptsache ebenso, wie es von den zahlreichen Versuchen aus der Literatur bekannt ist. Der Anstieg ist häufig schon nach wenigen Minuten deutlich; das Maximum liegt in der Mehrzahl zwischen $^1/_2$ bis $1^1/_2$ Stunden nach der Dextrosegabe (nur bei Nr. 9 erst nach etwa 2 Stunden) und die Rückkehr bis zum oder etwas unter den Nüchternwert erfolgt nach $2^1/_2$—4 Stunden. Der rasche Anstieg des Blutzuckers ist wohl durch bereits stattgehabte Resorption zu erklären. Daß die Hyperglykämie um so länger andauert, je größere Höhe sie erreicht hat, wie es von *Hamman* und *Hirschman*[1]) behauptet wird, läßt sich aus den Versuchen nicht ersehen.

Der später folgende Anstieg des R.-Q. setzt nun bei den Versuchen 1—4 ein, während sich die Blutzuckerkurve auf plateauartiger Erhebung bewegt; dagegen erfolgt er in den Versuchen 5—8 erst, wenn der Blutzucker schon sinkt. Vielleicht ist Versuch Nr. 5 noch zu denen zu rechnen, bei denen der R.-Q.-Anstieg auf der Höhe der Hyperglykämie einsetzt.

Bei einem Teil der Selbstversuche an einem von uns (*Bornstein*) ist die vorwiegende Kost des Vortages angegeben worden. Normalerweise war sie nach den Gewohnheiten der Versuchsperson ziemlich kohlenhydratreich. Wurde eine fettreiche Ernährung angestrebt, so wurde unter Fortlassung sonst genommener Kohlenhydrate vorwiegend Speck und Butter, sowie Fleisch und Käse gegessen. Der Nüchternwert des Blutzuckers ist hierdurch nicht beeinflußt worden, jedoch ist im Allgemeinen nach Fett-Eiweißkost ein mäßig stärkeres Ansteigen der Hyperglykämie auf die Dextrosegabe zu verzeichnen[2]). Der Nüchternwert des R.-Q. liegt nach der vorzugsweisen Fett-Eiweißdiät durchschnittlich tiefer und nach der Dextrosegabe ist in allen diesen Fällen ein deutliches Steigen des R.-Q. erkennbar. Es sind dieses die Versuche 5—8. Wurden am Vortage vorwiegend Kohlenhydrate gegessen, so steigt der R.-Q. nicht wesentlich im Verlaufe des Versuchs (s. Versuch 9 und 11).

Die Hämoglobinwerte lassen keinen Zusammenhang mit der Kost erkennen, weder im Ausgangswert noch in ihren Schwankungen während der Versuche. Die Schwankungen sind übrigens so gering, daß aus

[1]) *Hamman* und *Hirschman*, Bull. of Johns Hopkins hosp. **30**, 344. 1919.

[2]) *Bang* u. a. haben schon beobachtet, daß, wenn man einige Zeit nach einer Traubenzuckergabe nochmals die gleiche Zuckermenge verabfolgt, der Blutzucker nach der zweiten Gabe weniger steigt als nach der ersten.

ihnen die Bewegungen der Blutzuckerkurven nicht erklärt werden können. Es hat also dauernd eine annähernd gleiche Blutkonzentration vorgelegen.

Am 17. und 20. X. wurde untersucht, ob durch vorherige Zufuhr von Phosphorsäure die Verbrennung der Dextrose sich beschleunigen läßt, was nach den bekannten *Embden*schen Versuchen im Bereich der Möglichkeit lag. Es wurden vorher abends 9 Uhr 2,5 g und nachts 1 Uhr 5,0 g Mononatriumphosphat genommen. Beide Male blieb die *Phosphorsäure ohne Einfluß*: Die Kohlenhydratverbrennung setzte erst bei fallendem Blutzuckerspiegel ein (Versuch 7 u. 8).

Eine Eigentümlichkeit des R.-Q., die sich in allen Versuchen zeigt, besonders deutlich auch bei denen, die sonst keine wesentliche R.-Q.-Veränderung aufweisen, ist eine kurze, mäßige Senkung wenige Minuten nach der Dextrosezufuhr. Gut ausgeprägt ist diese kleine Senkung bei Versuch 1, 3, 4 und 8—11. Bei den 4 übrigen ist sie weniger scharf. Vielleicht handelt es sich dabei um eine Zurückhaltung von CO_2 zur Bindung des durch stärkere Magensalzsäureresektion im Augenblick der Nahrungszufuhr freiwerdenden Alkalis, wie es von *Bennet*, *Izod* und *Dodds* [1]) zu beweisen versucht worden ist. Die Erscheinung ist jedenfalls so regelmäßig, daß sie nicht unerwähnt bleiben darf.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß die Bewegungen des R.-Q. nicht durch primär veränderte Ausgiebigkeit der Atmung erklärt werden können, d. h. daß nicht eine aus anderem Grunde verstärkte Atmung und die damit verbundene stärkere CO_2-Abdunstung regelmäßig das Ansteigen des R.-Q. in den Versuchen bedingt, sowie umgekehrt. Gerade an typischen Stellen der Änderung des R.-Q. ist die Lungenventilation gleichmäßig, wie aus den Tabellen ersichtlich ist. Dieser Punkt bedarf besonderer Erwähnung, da bei den Untersuchungen unseres Instituts über die Adrenalinglykämie (l. c.) die durch das Adrenalin direkt vermehrte Lungenventilation und die damit verbundene vermehrte CO_2-Abdunstung von den Alveolen leicht fälschlich eine sofortige Verbrennung des mobilisierten Zuckers vortäuschen konnte.

Ist nach den besprochenen Respirationsversuchen der Blutzuckerspiegel nicht ohne Weiteres als Maß für die gleichzeitig stattfindende Kohlenhydratverbrennung anzusprechen, so lag die Annahme nahe, daß der R.-Q. sich parallel bewege zu dem augenblicklich im Serum herrschenden Verhältnis Fett: Dextrose. Zu diesem Zweck sind die *Versuche Nr. 19—25* angestellt worden. Bei den letzten 3 von diesen wurde statt Dextrose Brot, Marmelade, Zwieback und Speck zugeführt (s. Spalte „Bemerkungen" in der betr. Tabelle). Die Versuche konnten, da für die Fettbestimmung nach *Bloor* mehrere Kubikzentimeter Serum erforderlich sind, naturgemäß nicht so zahlreiche Blutentnahmen

[1]) *Bennet*, *Izod* und *Dodds*, Brit. Journ. of exp. pathol. **2**, Nr. 2, S. 58. 1921.

enthalten. Sie sind deshalb, wie oben ausgeführt, für den Vergleich der Kurven des Blutzuckers und des R.-Q. nicht hinreichend: für den vorliegenden Zweck genügen sie aber wohl.

Diese Versuchsreihe zeigt 3 Versuche (19. 22. 25). bei denen die Annahme, daß der R.-Q. durch das Verhältnis Serum-Fett : Serum-Zucker bestimmt werde, unnötig ist, da der R.-Q. sich (während der späten und wenigen Entnahmen) parallel dem Blutzucker bewegt.

2 Versuche (23 u. 24) könnten durch die gemachte Annahme erklärt werden. Bei Versuch 23 steigt der R.-Q. bei sinkendem Fettgehalt und gleichbleibendem Zucker, während in Versuch 24 der R.-Q. bei steigendem Fettgehalt und kaum verändertem Zucker sinkt.

Die übrigbleibenden 2 Versuche (20 u. 21) können durch die Annahme nicht erklärt werden, da sich der R.-Q. entgegen dem steigenden Verhältnis Serum-Fett : Serum-Zucker oder unabhängig von dem gleichbleibenden Verhältnis bewegt.

Das Verhältnis Serum-Fett : Serum-Zucker bestimmt also den R.-Q. ebensowenig wie der Zucker allein.

Versuche auf dem Tretrade nüchtern (Nr. 12—14) und mit Dextrosezufuhr (Nr. 15—18).

Diese Versuche wurden angestellt, um zu untersuchen, wie eine natürliche durch Muskelarbeit geschaffene Nachfrage nach Kohlenhydraten die Veränderungen des Blutzuckerspiegels und des R.-Q. beeinflußt. Die Versuchsperson saß während des Versuchs auf einem frei montierten, ungebremsten Zweirade und trat die Pedale mit einer Geschwindigkeit von 48 Umdrehungen in der Minute. Der Gaswechsel wurde vor dem Beginn des Tretens liegend bei vorsätzlicher Muskelruhe, nach Beginn der Muskelarbeit und dann fortlaufend nach der Dextrosegabe von 100 g bestimmt bzw. fortlaufend ohne die Dextrosegabe. Wie die Tabellen zeigen, war die Nahrung am Vortage des Versuchs eine überwiegend aus Fett und Eiweiß bestehende. Im übrigen ist über die Versuchsanordnung nichts zu sagen. Sie war wie bei den vorhergehenden Versuchen.

Die Versuche Nr. 12—14 sind solche ohne Dextrosezufuhr. Im allgemeinen ist ein ganz leichtes Sinken des Blutzuckerspiegels zu verzeichnen. Der R.-Q. zeigt kleine, unregelmäßige, nicht eindeutige Schwankungen. Im Wesentlichen bleiben beide Größen unverändert. Die Lungenventilation erreicht bei der Muskelarbeit das 2—$2^1/_2$fache des Ruhewerts und stellt sich leidlich gleichmäßig ein.

Die Versuche 15—18 weisen im Mittel eine etwas geringere Steigerung des Blutzuckers auf als die Ruheversuche 1—11; auch setzt die Steigerung, manchmal nach anfänglicher geringer Senkung, später ein als bei den Ruheversuchen, und zwar nach $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde. Das Maximum

der Blutzuckerkurve liegt um 60—70 Minuten nach der Dextrosegabe und der Nüchternwert ist 2mal schon nach etwa 100 Minuten erreicht.

In dem wesentlichsten Punkte, dem verzögerten Steigen des R.-Q., stimmen diese Versuche mit dem Ergebnis von Versuch 1—11 überein und zwar beginnt das Ansteigen 45—75 Minuten nach der Dextrosegabe. Es erfolgt hauptsächlich bei noch auf der Höhe befindlichem oder bereits fallendem Blutzucker. Eine Ausnahme bildet nur Versuch Nr. 18, bei dem beide Größen sich kurze Zeit gleichzeitig in aufsteigender Kurve bewegen. Im übrigen bewegt sich der R.-Q. etwas unruhiger auf und ab als bei den Ruheversuchen. Die feineren Ausschläge, wie die dort beobachtete kleine anfängliche Senkung, sind vielleicht aus diesem Grunde hier nicht erkennbar.

Diese Versuche ergeben also keine bedeutenden Unterschiede gegenüber den Ruheversuchen 1—11 in dem Verhalten von Blutzucker und R.-Q. zueinander. Im ganzen erscheinen die Vorgänge zeitlich etwas zusammengedrängter abzulaufen.

Versuche mit vorsätzlicher Muskelruhe und 100 g Lävulose (Nr. 26—28).

Diese Versuche sind genau so angeordnet wie die Versuche 1—11, nur wurde statt 100 g Dextrose 100 g Lävulose gegeben.

Das Ergebnis dieser Versuche ist ein erheblich verschiedenes von den Dextroseversuchen: Die vermehrte Kohlenhydratverbrennung setzt wenige Minuten nach der Lävulosezufuhr ein!

Im Einzelnen ist zu diesen Versuchen Folgendes zu sagen: Es sind nur 3 Versuche angestellt worden, da ihre Ergebnisse außerordentlich übereinstimmend und deutlich sind. Nach der Lävulosegabe steigt der Blutzuckergehalt trotz der Fett-Eiweißdiät am Vortage weniger als nach Dextrosezufuhr. Die Steigerung setzt in einem Falle schon nach wenigen Minuten ein, im zweiten ist sie nach einer Viertelstunde deutlich und im dritten fehlt sie ganz. Der Nüchternwert ist nach 3—4 Stunden wieder erreicht.

Der R.-Q. steigt schon wenige Minuten nach der Lävulosezufuhr erheblich an, ganz gleich, ob der Blutzucker überhaupt erhöht wird oder sein Anstieg noch nicht deutlich geworden ist. Während der vielstündigen Versuche (über 5 Stunden) kehrt er nicht zum Nüchternwert zurück; die sofort einsetzende erhöhte Kohlenhydratverbrennung hält also noch an.

Besprechung.

Als wichtigstes Ergebnis dieser Versuche ist die Tatsache zu nennen, daß der peroral gegebene Traubenzucker sehr schnell resorbiert wird, so daß er schon nach wenigen Minuten im Blute nachweisbar ist, daß er aber zunächst nicht einer Oxydation anheimfällt. Er ist also anfangs nicht oxydabel, auch wenn er den Organen in großer Menge angeboten

wird. Dieser Zustand hält eine halbe Stunde und länger an und man wird sich vorstellen können, daß während dieser Zeit im Organismus irgendwelche Prozesse sich abspielen, die die Verbrennung des Zuckers vorbereiten. Diese Vorgänge können entweder am Zucker selbst oder an der Zusammensetzung der Gewebe angreifen und wir können demnach 2 Möglichkeiten unterscheiden:

1. Durch den angebotenen Zucker wird die Bildung eines Oxydationsfermentes angeregt, durch das der Zucker dann verbrannt wird. Im einzelnen könnte man sich diesen Vorgang sehr verschieden vorstellen.

2. Der angebotene Zucker wird in eine Form verwandelt, in der er für das oxydierende Ferment erst angreifbar geworden ist. Diese Umwandlung würde wohl auch durch ein Ferment vor sich gehen, aber nicht durch ein Oxydationsferment.

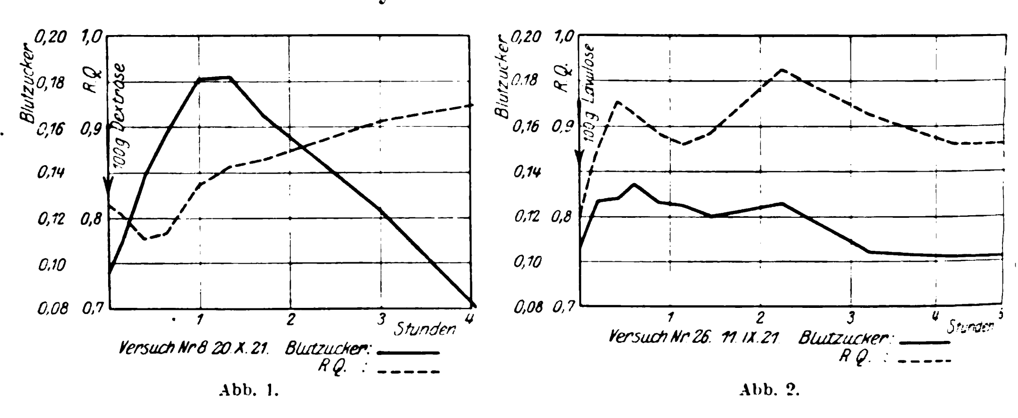


Abb. 1. Abb. 2.

Für die Entscheidung dieser Frage geben uns die Lävuloseversuche wichtige Hinweise. Würde es sich darum handeln, daß erst die Fermente der eigentlichen Oxydation gebildet würden, so könnten wir erwarten, daß auch bei Lävulose nach der Resorption ein solches Vorstadium sich finden müßte, während dessen der R.-Q. nicht ansteigt. Das ist aber nicht der Fall. Nach der Resorption der Lävulose tritt sofort eine deutliche Verbrennung dieses Zuckers ein. Die einfachste Art, diese Erscheinungen zu interpretieren, bestände in der Annahme, daß die Verbrennung des Traubenzuckers über die Lävulose oder über einen der Lävulose nahestehenden Körper vor sich ginge. Diese Anschauung würde nicht in Widerspruch stehen zu dem, was sonst über die Beziehungen von Traubenzucker und Lävulose zueinander bekannt ist. es seien nur die Ausführungen von *Isaac*[1]) erwähnt.

Einige Analogien scheinen bei der alkoholischen Zuckergärung vorzuliegen. Dabei kann eine Veresterung des Traubenzuckers mit

[1]) *Isaac*, Med. Klin. 1920, S. 1207.

Phosphorsäure eintreten, bei der, wie *Harden* und *Young*, *Neuberg*[1]) u. a. zeigten, Lävulosephosphorsäure sich bildet. Auch mit Lävulose tritt eine solche Veresterung mittels Hefeextrakt sofort ein, wie *Euler*, *Ohlsén* und *Johansson*[2]) fanden. Traubenzucker muß jedoch vorher erst einige Zeit mit lebender Hefe in Berührung gewesen sein, dann läßt auch er sich durch Hefeextrakt in Lävulosephosphorsäure verestern. Ob diese Bildung von Lävulosephosphorsäure bei der Gärung von Traubenzucker und Lävulose ein normaler Vorgang ist, ist allerdings nach *Neuberg*[3]) noch zweifelhaft, ebenso ob die Gärung über die Phosphorsäureverbindung weitergeht. Nach *Embden*[4]) soll im Organismus der höheren Tiere die Verbrennung des Traubenzuckers über die Lävulosephosphorsäure vor sich gehen.

Es erscheint uns demnach am wahrscheinlichsten, daß der Traubenzucker in Lävulose oder einen der Lävulose nahestehenden Körper verwandelt wird. Versuche, die diese Frage weiter klären sollen, sind in Vorbereitung.

Zusammenfassung.

1. *Wenige Minuten nach peroraler Zufuhr von 100 g Traubenzucker beginnt beim nüchternen Menschen der Blutzucker zu steigen. Respirationsversuche zeigen, daß die Verbrennung des im Blute kreisenden Zuckers zu dieser Zeit noch nicht beginnt. Sie setzt erst eine halbe bis eineinhalb Stunden später ein, nachdem der Blutzucker schon recht hohe Werte angenommen, häufig nachdem er schon den Maximalwert erreicht oder überschritten hat. Die weitere Verbrennung des zugeführten Zuckers kann bei niedrigen Blutzuckerwerten erfolgen. Ein Parallelismus zwischen Höhe des Blutzuckers und Umfang der Zuckerverbrennung nach Traubenzuckerzufuhr besteht also nicht.*

2. Versuche, in denen Phosphat vor dem Traubenzucker gegeben wurde, zeigten keinen deutlichen Einfluß des Phosphats auf die Kohlenhydratverbrennung. Bei Körperarbeit steigt der Blutzucker nach Traubenzuckerzufuhr im allgemeinen weniger hoch, die Zuckerverbrennung setzt nicht früher ein.

3. Gleichzeitige Bestimmungen von Serumzucker, Serumfett und respiratorischem Stoffwechsel zeigten, daß nach Kohlenhydratzufuhr der Umfang der Kohlenhydratverbrennung auch nicht durch das Verhältnis Serumfett : Serumzucker bestimmt wird.

4. *Nach peroraler Zufuhr von 100 g Lävulose beginnt schon nach wenigen (5—8) Minuten eine vermehrte Zuckerverbrennung. Der Blutzucker steigt dabei wenig oder gar nicht.*

---

[1]) *Neuberg*, *Färber*, *Levita* und *Schwenk*, diese Zeitschr. **83**, 244.
[2]) *Euler*, *Ohlsén* und *Johansson*, diese Zeitschr. **83**, 402.
[3]) *Neuberg*, diese Zeitschr. **103**, 300.
[4]) *Embden*, zit. nach *Isaac*.

5. Es erscheint wahrscheinlich, daß der Traubenzucker vor seiner Verbrennung in Lävulose oder einen der Lävulose nahestehenden Körper verwandelt wird.

6. Gibt man nach 12stündigem Hunger 100 g Traubenzucker, so steigt der Blutzucker im Allgemeinen weniger an, wenn man vor dem Hungern eine Kohlenhydratmahlzeit gegeben hat, als wenn man vorher eine Fett-Eiweißmahlzeit gab. Gibt man z. B. zu diagnostischen Zwecken Dextrose per os, so wird man am gleichen Individuum ein verschiedenes Verhalten von Blutzucker und alimentärer Glykosurie erwarten müssen, je nachdem am Tage vorher eine kohlenhydratreiche oder kohlenhydratarme Kost gegeben war[1]).

Generaltabelle.

Nr.	Minuten nach Dextrose	Ventilation Liter in der Minute	CO_2-% in der Expirationsluft	Pro Minute ccm CO_2	Pro Minute ccm O_2	R.-Q.	Blutzucker %	Hämoglobin %	Bemerkungen
				Versuch Nr. 1. *Ludvika.* 8. IV. 21.					
1	vorher	3,840	5,13	182,3	216,2	0,843	—	—	
2	„	4,618	4,70	199,7	231,6	0,862	0,110	64	← 100 g Dextrose
3	9—19	4,960	4,67	213,0	259,5	0,821	0,206	74	
4	27—36	5,694	4,61	240,8	269,3	0,894	0,219	58	
5	46—55	5,744	4,69	246,7	257,4	0,958	0,191	61	
6	65—74	5,656	4,51	233,6	250,6	0,932	0,167	62	
				Versuch Nr. 2. *Frl. Steen.* 29. VIII. 21.					
1	vorher	5,745	3,60	182,3	239,1	0,762	—	—	
2	„	5,760	3,58	181,4	225,3	0,805	0,132	87	← 100 g Dextrose
3	15—24	5,478	3,63	174,8	230,1	0,760	0,171	88	
4	26—34½	5,883	3,54	182,7	238,7	0,766	0,194	90	
5	37—45	6,275	3,49	192,0	249,5	0,769	0,230	90	
6	47—55	6,600	3,60	208,1	248,8	0,836	0,231	88	
7	57—68½	6,810	3,59	214,1	247,5	0,865	0,223	75	
8	71—83½	6,688	3,51	205,4	231,5	0,887	0,206	81	
9	101—113½	6,480	3,55	201,2	227,2	0,886	0,190	81	
				Versuch Nr. 3. *Frl. Steen.* 31. VIII. 21.					
1	vorher	5,567	3,51	177,2	234,5	0,756	—	—	
2	„	4,770	3,52	152,0	207,0	0,734	0,099	80	← 100 g Dextrose
3	7—24	4,682	3,45	146,3	217,7	0,672	0,148	88	
4	26—40	5,379	3,60	175,0	233,9	0,748	0,172	88	
5	43—57	5,779	3,47	180,9	226,8	0,798	0,197	85	
6	61—73½	6,768	3,50	213,5	229,9	0,929	0,202	81	
				Versuch Nr. 4. *Bornstein.* 29. VII. 21.					
1	vorher	5,327	4,48	207,2	244,9	0,846	0,093	101	← 100 g Dextrose
2	6—14½	5,729	4,26	211,7	258,5	0,819	0,106	102	
3	17—25	5,650	4,42	216,5	254,5	0,851	0,120	107	
4	28—37½	5,147	4,22	188,2	222,8	0,845	0,155	105	
5	40—49½	5,548	4,38	210,5	240,5	0,875	0,153	108	
6	53—63½	6,219	4,43	200,3	224,5	0,892	0,150	104	
7	67—79	5,983	4,44	230,1	257,9	0,892	0,147	98	

[1]) Nachschr. bei der Korrektur. Zu dem letzten Punkt s. die Arbeit von *Staub*, Zeitschr. f. klin. Medizin **93**, 123. 1922.

Generaltabelle (Fortsetzung).

Nr.	Minuten nach Dextrose	Ventilation Liter in der Minute	CO_2-% in der Expirationsluft	Pro Minute ccm CO_2	Pro Minute ccm O_2	R.-Q.	Blutzucker %	Hämoglobin %	Bemerkungen
				Versuch Nr. 5. *Bornstein.* 1. IX. 21.					Fett-Eiweiß-Diät
1	vorher	4,543	4,25	175,0	217,5	0,805	—	—	
2	"	4,441	4,22	169,6	215,1	0,788	0,084	100	← 100 g Dextrose
3	6—17½	4,504	4,37	178,1	230,5	0,773	0,097	100	
4	19—29	4,770	4,17	179,7	229,7	0,782	0,107	100	
5	32—47½	4,890	4,15	183,1	230,4	0,795	0,132	104	
6	52—68½	4,776	4,18	180,0	216,2	0,832	0,143	103	
7	72—88	4,681	4,17	175,9	216,7	0,812	0,126	103	
8	92—108	4,919	4,23	187,5	219,6	0,854	0,130	101	
9	112—128½	4,879	4,25	186,8	219,8	0,850	0,132	103	
10	149—166½	4,893	4,35	191,8	219,9	0,872	0,117	101	
11	183—199	4,881	4,32	189,8	220,0	0,863	0,117	102	
				Versuch Nr. 6. *Bornstein.* 4. IX. 21.					Fett-Eiweiß-Diät
1	vorher	4,660	4,27	180,4	233,1	0,774	—	—	
2	"	4,449	4,22	170,0	215,1	0,790	0,089	99	← 100 g Dextrose
3	6—15	5,500	4,25	211,4	268,4	0,788	0,117	102	
4	16—25½	5,116	4,24	195,9	256,9	6,763	0,121	102	
5	28—44	4,950	4,10	183,2	240,0	0,763	0,120	98	
6	46—62	4,994	4,31	194,2	244,7	0,794	0,152	97	
7	64—80	4,944	4,22	188,0	238,0	0,790	0,171	97	
8	82—97½	4,852	4,20	183,6	232,1	0,791	0,177	102	
9	105—121½	4,939	4,35	193,8	226,3	0,857	0,168	95	
10	143—157	4,978	4,30	197,2	229,9	0,858	0,152	102	
11	206—221	4,947	4,37	199,5	227,1	0,877	0,123	97	
12	286—203	4,718	4,25	181,3	209,5	0,865	0,087	105	
				Versuch Nr. 7. *Bornstein.* 17. X. 21.					Fett-Eiweiß-Diät Phosphat!
1	vorher	4,906	4,20	189,0	226,8	0,833	—	—	
2	vorher	4,606	4,10	172,9	212,1	0,815	0,123	101	← 100 g Dextrose
3	6—15½	5,253	4,13	198,9	247,3	0,804	0,131	100	
4	18—27	5,222	3,89	185,8	232,0	0,801	0,149	100	
5	30—47	5,059	3,80	175,5	210,8	0,832	0,146	100	
6	50—64½	5,441	4,00	198,6	229,6	0,865	0,159	100	
7	66—69½	5,481	3,90	194,9	221,6	0,879	0,163	100	
8	72—86½	5,490	4,01	200,7	231,9	0,865	0,152	100	
9	163—177½	5,248	4,22	202,5	223,3	0,907	0,128	99	
				Versuch Nr. 8. *Bornstein.* 20. X. 21.					Fett-Eiweiß-Diät Phosphat!
1	vorher	4,544	4,15	172,5	211,2	0,817	0,096	107	
2	6—16	5,090	4,17	194,1	242,1	0,802	0,110	104	← 100 g Dextrose
3	18—27	4,933	3,96	178,3	229,4	0,777	0,138	104	
4	30—47½	5,006	3,87	176,6	225,4	0,783	0,158	104	
5	50—68½	4,282	4,41	172,2	206,0	0,838	0,181	108	
6	73—90	4,971	4,12	186,5	218,7	0,852	0,182	104	
7	93—109	4,800	4,12	179,9	208,3	0,864	0,166	104	
8	175—190½	5,129	4,24	198,3	218,5	0,907	0,120	104	
9	236—251½	5,264	4,16	200,0	211,0	0,948	0,079	108	

Generaltabelle (Fortsetzung).

Nr.	Minuten nach Dextrose	Ventilation Liter in der Minute	CO_2-% in der Expirationsluft	Pro Minute ccm CO_2	Pro Minute ccm O_2	R.-Q.	Blutzucker %	Hämoglobin %	Bemerkungen
			Versuch Nr. 9.	*Bornstein.*	**8. IX. 21.**				**K. H.-Kost.**
1	vorher	5,421	4,39	215.7	221,3	0,975	—	—	
2	"	5,255	4,28	198,9	211,3	0.941	0,104	84	← 100 g Dextrose
3	6—15	5,333	4,30	207,5	231,5	0,896	0,111	84	
4	17—26½	5,337	4,27	205,9	230.4	0,893	0,114	81	
5	29—43½	5,441	4,25	208,6	225,4	0.925	0,126	80	
6	47—60½	5,518	4,20	208,8	225,2	0,927	0,138	76	
7	63—79	5,362	4.15	200,4	216,3	0.926	0.138	77	
8	81—96	5.260	4,25	201,2	213,9	0,941	0,141	80	
9	128—142½	5.448	4,37	216,1	227,5	0,950	0,161	84	
10	164—179½	5,142	4,48	207,4	226,3	0.917	0,149	80	
11	224—239½	5,025	4,43	200,6	204,1	0,983	0,098	80	
12	287—303	4,712	4,52	192,1	202,4	0,949	0.097	80	
			Versuch Nr. 10.	*Bornstein.*	**1. VIII. 21.**				
1	vorher	5,321	4,34	204,6	243,0	0,842	—	—	
2	"	5.212	4,31	198,8	228,1	0,871	0,095	102	← 100 g Dextrose
3	6—14½	5,482	4,27	207,0	243,5	0,850	0,090	100	
4	16—25½	5,358	4,30	203,5	251.6	0,809	0,100	107	
5	27—36	5,744	4,22	213,9	252.0	0,849	0,110	106	
9	38—46	5,650	4,27	212,7	242,5	0,877	0,105	104	
7	48—57½	5,495	4,18	207,1	244,3	0,848	0,105	103	
8	60—75	5.407	4,21	205.2	244,3	0,840	0,095	100	
9	77—91½	5,618	4,21	213,1	246,0	0,866	0,120	104	
			Versuch Nr. 11.	*Bornstein.*	**24. VIII. 21.**				**K. H.-Kost.**
1	vorher	5,457	4,23	205,5	227,8	0.903	0,091	78	
2	"	5,078	4,20	189,6	213,7	0.887	—	—	← 100 g Dextrose
3	6—14½	5,365	4,22	201.2	234,6	0,858	0,104	81	
4	17—26	5,289	4,24	199,0	228,3	0,872	0,106	80	
5	28—36	5,275	4.33	202,6	227,0	0.892	0,104	71	
6	38—47½	4.895	4,05	175,6	209.9	0,837	0,108	77	
7	51—59½	5,447	4,15	200,3	240,8	0.832	0,114	77	
8	64—78½	5,069	4,37	196,1	221,8	0,884	0,098	75	
9	82—96	5,271	4,26	198,7	222,5	0,893	0,099	77	
10	100—114½	4.924	4,48	195,3	215,8	0,905	0,114	77	
	Min. n. Beginn des Tretens.		**Versuch Nr. 12.**	*Bornstein.*	**27. X. 21.**				**Fett-Eiweiß-Diät**
1	vorher	4.840	4,16	183,3	219,9	0,834	—	—	
2	"	4,832	4,03	177,0	214,2	0,828	0,118	78	
3	6—14½	10,259	4,40	409,4	511,4	0,801	—	—	
4	21—29	10,337	4,67	436,6	535,3	0,816	0,109	81	
5	36—44	10,438	4,68	441,2	542,0	0.814	—	—	
6	61—68	11,247	4,58	465,6	561,4	0,829	0,099	81	
7	82—89½	11,240	4,52	459.0	562,3	0,816	—	—	
8	101—108½	10,973	4.52	448.4	541,8	0,828	0,091	80	
9	121—128	11,846	4,39	456,3	559,5	0,816	—	—	
10	140—147½	11,933	4,59	453,3	553,8	0,819	0,080	79	

Generaltabelle (Fortsetzung).

Nr.	Minuten nach Beginn des Tretens	Ventilation Liter in der Minute	CO_2-% in der Expirationsluft	Pro Minute ccm CO_2	Pro Minute ccm O_2	R.-Q.	Blutzucker %	Hämoglobin %	Bemerkungen
	Versuch Nr. 13.	*Bornstein.*	3. XI. 21.						Fett-Eiweiß-Diät
1	vorher	4,149	3,98	148,6	191,0	0,778	—	—	
2	"	4,115	3,96	146,2	185,8	0,787	0,091	88	
3	5—13	10,187	4,48	408,9	511,2	0,800	—	—	
4	$20—28^{1}/_{2}$	9,835	4,56	400,0	490,4	0,816	—	—	
5	$31—39^{1}/_{2}$	9,576	4,42	377,8	461,7	0,818	0,079	74	
6	44—52	10,212	4,47	406,3	501,2	0,811	—	—	
7	60—68	10,450	4,48	416,5	501,8	0,830	0,078	75	
8	75—83	10,587	4,38	412,4	499,9	0,825	—	—	
9	90—98	11,025	4,32	423,7	518,6	0,817	0,073	84	
0	100—108	10,725	4,34	414,0	503,9	0,822	—	—	
1	130—138	10,557	4,31	404,9	483,9	0,837	0,086	79,5	
	Versuch Nr. 14.	*Bornstein.*	10. XI. 21.						Fett-Eiweiß-Diät
1	vorher	4,983	3,88	179,4	230,1	0,780	—	—	
2	"	4,997	3,83	177,1	220,2	0,805	0,112	91	
3	5—14	9,633	4,36	388,6	488,4	0,796	—	—	
4	20—29	9,178	4,25	359,5	443,6	0,811	—	—	
5	31—39	9,450	4,20	365,1	458,1	0,797	0,092	84	
6	44—52	9,821	4,13	372,9	458,0	0,814	—	—	
7	$60—68^{1}/_{2}$	9,694	4,22	376,1	464,7	0,809	—	—	
8	$80—88^{1}/_{2}$	10,035	4,02	370,4	461,9	0,802	0,100	82	
9	$100—108^{1}/_{2}$	9,765	4,14	371,6	463,0	0,803	—	—	
0	120—130	9,630	4,08	361,4	446,0	0,810	—	—	
1	140—148	10,062	4,06	375,6	464,1	0,809	0,096	82	

Nr.	Minuten nach Beginn des Tretens	Minuten nach Dextrose	Ventilation Liter in der Minute	CO_2-% in der Expirationsluft	Pro Minute ccm CO_2	Pro Minute ccm O_2	R.-Q.	Blutzucker %	Hämoglobin %	Bemerkungen
		Versuch Nr. 15.	*Bornstein.*	14. XI. 21.						
1	vorher	vorher	4,742	3,95	171,8	220,1	0,781	—	—	
2	"	"	4,710	3,94	169,8	211,1	0,805	0,115	93	
3	5—13	"	9,588	4,37	382,9	465,5	0,824	0,099	90	←100 g Dextrose
4	20—29	5—14	9,822	4,34	387,8	475,4	0,816	0,113	91	
5	31—39	16—24	9,988	4,42	400,7	486,1	0,824	0,135	90	
6	45—53	30—38	10,488	4,30	399,3	492,7	0,810	0.169	87	
7	60—68	45—53	10,750	4,33	421,2	483,1	0,872	0,163	87	
8	75—83	60—68	10,812	4,18	408,9	493,6	0,828	0,171	90	
9	95—103	80—88	10,862	4,33	426,1	484,9	0,879	0,156	88	
0	115—122	100—107	10,071	4,37	438,2	493,2	0,889	0,116	90	
1	135—143	120—128	10,600	4,28	413,0	474,7	0,866	0,104	86	

Generaltabelle (Fortsetzung).

Nr.	Minuten nach Beginn des Tretens	Minuten nach Dextrose	Ventilation Liter in der Minute	CO_2-% in der Expirationsluft	Pro Minute ccm CO_2	Pro Minute ccm O_2	R.-Q.	Blutzucker %	Hämoglobin %	Bemerkungen
				Versuch Nr. 16. *Bornstein.* **24. X. 21.**						Fett-Eiweiß-Diät
1	vorher	vorher	4.724	4,29	182.8	219,2	0.834	—	—	
2	„	„	4.671	4.36	183.3	218,1	0.840	0.092	112	
3	11–18	„	11.100	4.75	471.5	571,3	0.825	—	—	
4	22–30	„	11.591	4.61	476.0	578,4	0.823	0.094	109	← 100 g Dextrose
5	36–43	5–12	11.564	4.52	464.9	577,6	0.805	0.090	108	
6	47–53½	16–22½	12,769	4.38	485.2	596.0	0.814	0,111	109	
7	61–67½	30–36½	13.338	4.42	522.6	634.1	0.824	0.141	112	
8	75–81	44–50	14.917	4.64	613,9	713.2	0.861	0.126	112	
9	90–96½	59–65½	13,538	4,60	552.3	625.6	0.883	0.123	112	
10	104–110½	73–79½	13.631	4.45	539,1	602.0	0.895	0,110	111	
11	120–126	89–95	14.367	4.63	589.9	656.4	0,899	0.113	112	
12	132–138½	101–107½	13.969	4,48	569,7	616,3	0,924	0,108	109	
				Versuch Nr. 17. *Bornstein.* **1. XI. 21.**						Fett-Eiweiß-Diät
1	vorher	vorher	4.981	4.02	177,0	212.9	0.831	—	—	
2	„	„	4.663	3,85	158,6	200.0	0.793	0.106	109.5	
3	6–14	„	10.675	4.74	447.5	532,8	0,840	0,095	109.5	← 100 g Dextrose
4	20–27	6–13	11,029	4,73	460.2	546.8	0,842	0,097	102,5	
5	30–37½	16–23½	10,853	4,76	454.7	543.5	0.837	0,120	105.5	
6	41–49	27–35	10,800	4.72	448,6	521.2	0,861	0,115	107	
7	59–66½	45–52½	11,760	4,58	474,0	549.1	0.863	0,137	104	
8	70–77	56–63	11,829	4,76	496.0	572,8	0.866	0.141	107	
9	82–89	68–75	12,300	4.64	502,8	560.9	0,899	0,118	109,5	
10	94–101	80–87	11,843	4.61	481,6	541,5	0.899	0,106	105,5	
11	106–113½	92–99½	12,467	4,73	520.8	567,0	0,919	0,103	—	
				Versuch Nr. 18. *Bornstein.* **8. XI. 21.**						Fett-Eiweiß-Diät
1	vorher	vorher	5,118	4.03	185.3	226.9	0.817	—	—	
2	„	„	5.187	3,99	188.8	229.2	0.824	0.101	82	
3	5–14	„	10.056	4.66	424.6	500.1	0.849	0.111	78	← 100 g Dextrose
4	21–29½	6–14½	10,035	4.41	399,5	476.8	0.838	0.098	78	
5	32–40	17–25	9.912	4.34	387,7	469.7	0.826	0,108	81	
6	44–52½	21–29½	10.225	4.26	392,1	476.6	0,823	0,130	80	
7	57–64½	34–41½	10.773	4.35	421.9	482,5	0.874	0.165	78	
8	71–78½	48–55½	10,787	4,42	429.2	481.2	0.892	0,157	77	
9	84–92	61–69	11,150	4,40	442,3	488.3	0.906	0,143	78	
10	98–105½	75–82½	11.267	4.32	438,6	490.4	0,895	0,134	77	
11	112–119½	89–96½	10,960	4,41	435,6	486.0	0.896	0,134	82	

Nr.	Minuten nach Dextrose	Ventilation Liter in der Minute	CO_2-% in der Expirationsluft	Pro Minute ccm CO_2	Pro Minute ccm O_2	R.-Q.	Serumzucker %	Serumfett %	Eiweiß- (Refraktion) %	Hämoglobin %	Bemerkungen
				Versuch Nr. 19. *Jacobsen.* **29. III. 21.**							
1	vorher	5.100	3.81	176,1	203.8	0,864	0,133	1,325	7.63	—	
2	„	5,000	3.79	171.1	208,0	0,825	—	—	—	—	← 100 g Dextrose
3	48–61½	6.074	3.91	214.5	218,0	0,984	0,145	1,45	7,63	—	
4	74–87	6.223	3,90	218,7	220.1	0.994	0.201	1.465	7,63	—	
5	100–115	5,633	3,68	186.0	196.3	0,948	0.118	1,38	7,63	—	

Generaltabelle (Fortsetzung)

r.	Minuten nach	Ventilation Liter in der Minute	CO_2-% in der Expirationsluft	Pro Minute ccm CO_2	Pro Minute ccm O_2	R.-Q.	Serumzucker %	Serumfett %	Eiweiß- (Refraktion) %	Hämoglobin %	Bemerkungen
				Versuch Nr. 20. *Ludvika.* 2. IV. 21.							
1	vorher	4,576	4,38	184,5	230,6	0,800	—	—	—	—	
2	"	4,494	4,27	176,2	223,5	0,788	0,111	1,46	8,70	—	← 102 g Dextrose
3	58—72	5,786	4,40	233,9	249,5	0,938	0,114	1,45	9,02	—	
4	88—103	5,300	4,47	216,3	227,3	0,951	0,113	1,50	8,60	—	
5	119—136	4,665	4,57	194,3	239,8	0,810	0,115	1,52	8,70	—	
				Versuch Nr. 21. *Ludvika.* 5. IV. 21.							
1	vorher	4,367	4,56	182,5	214,1	0,852	—	—	—	—	
2	"	4,262	4,74	184,9	220,2	0,840	0,107	1,39	8,81	—	← 100 g Dextrose
3	54—68	5,659	4,60	238,0	249,1	0,955	0,116	1,51	10,20	—	
4	85—101	5,033	4,45	204,8	223,5	0,916	0,107	1,355	8,81	—	
5	117—134	4,412	4,61	184,7	224,2	0,824	0,101	—	8,92	—	
				Versuch Nr. 22. *Bornstein.* 7. IV. 21.							
1	vorher	6,054	4,38	244,2	264,9	0,922	—	—	—	—	
2	"	5,885	4,31	231,9	255,7	0,911	0,118	1,58	—	111	← 100 g Dextrose
3	13—25½	6,344	4,56	265,8	282,1	0,942	0,120	1,53	—	104	
4	41—53½	6,248	4,44	254,9	264,4	0,964	0,135	1,59	—	102,5	
5	59—73	6,007	4,45	245,7	251,3	0,978	—	—	—	—	
				Versuch Nr. 23. *Ludvika.* 9. III. 21.							
1	vorher	4,529	4,85	201,3	232,4	0,866	0,104	1,40	8,28	—	
2	"	5,206	5,07	240,7	270,3	0,890	—	—	—	—	← 178 g Weiß-
3	139—154	5,333	4,94	240,2	253,8	0,946	—	—	—	—	brötchen [illegible] 24 g
4	164—179	5,167	4,91	231,2	256,3	0,902	—	—	—	—	Marmelade
5	191—208	4,682	4,81	208,6	230,4	0,906	0,101	1,17	9,35	—	
				Versuch Nr. 24. *Ludvika.* 11. III. 21.							
1	vorher	4,812	4,46	193,5	218,4	0,886	0,126	1,31	8,70	—	
2	"	4,729	4,40	187,2	225,2	0,829	—	—	—	—	← 125 g Speck
3	22—38	4,725	4,37	184,8	226,3	0,817	—	—	—	—	
4	54—71	4,953	4,17	183,7	224,1	0,820	0,110	1,55	8,70	—	
5	87—104	4,953	4,31	190,4	232,6	0,818	—	—	—	—	
6	120—136	4,637	4,30	178,2	227,8	0,782	—	—	—	—	
				Versuch Nr. 25. *Ludvika.* 14. III. 21.							
1	vorher	4,869	4,54	200,7	222,7	0,899	—	—	—	—	← 114 g Speck
2	125—142	4,875	4,79	210,7	241,4	0,871	0,115	1,34	9,24	—	← 125 Min.: 160 g
3	157—171	5,600	4,53	227,7	245,6	0,927	—	—	—	—	Zwieback + 60 g
4	188—202	5,857	4,72	247,7	266,4	0,930	0,180	1,70	8,70	—	Marmelade.

Generaltabelle (Fortsetzung).

Nr.	Minuten nach Lävulose	Ventilation Liter in der Minute	CO_2-% in der Expirationsluft	Pro Minute ccm CO_2	Pro Minute ccm O_2	R.-Q.	Blutzucker %	Hämoglobin %	Bemerkungen
			Versuch Nr. 26.	*Bornstein.*	11. IX. 21.				Fett-Eiweiß-Diät
1	vorher	4.743	4.56	193.4	246.2	0.785	—	—	
2	..	4.624	4.58	189.1	235.9	0.802	0.106	85	← 100 g Lävulose
3	8—17	5.344	4.39	209.6	238.9	0.878	0.127	82	
4	19—27	6.025	4.39	235,9	253.7	0.930	0.129	78	
5	29—42	5.800	4.35	224.7	245.7	0.914	0.135	80	
6	45—59	5.497	4.20	202.1	226.6	0.892	0.127	75	
7	63—76½	5,778	4.20	215.7	244.6	0.882	0.125	82	
8	80—94½	5.634	4.29	214.8	241.0	0.891	0.121	85	
9	130—143	5.854	4.72	246.6	255.9	0.964	0.126	84	
10	184—200	5.137	4.59	210.2	230.1	0.914	0.105	82	
11	245—261	4.906	4.48	196.1	222.2	0.882	0.100	82	
12	313—329	4.650	4.55	184.5	209,3	0,881	0,102	82	
			Versuch Nr. 27.	*Bornstein.*	13. IX. 21.				Fett-Eiweiß-Diät
1	vorher	4.855	4,20	185.0	234.4	0.789	—	—	
2	„	4,659	4.25	179.3	223.3	0.803	0.091	82	← 100 g Lävulose
3	6—16	5.120	4.43	205.4	244.4	0.840	0.095	85	
4	18—27	5.111	4.23	195.4	234,2	0.834	0.096	84	
5	29—43½	5.062	4.25	194.1	221.4	0.879	0.096	82	
6	45—60½	4.929	4.13	183.5	216,4	0.848	0.093	85	
7	64—81	4,935	4.24	188,6	221,1	0.853	0.091	84	
8	83—99	4.894	4.18	184,4	217,5	0.848	0,094	82	
9	144—159½	5.045	4.37	199,2	219.4	0.908	0,095	88	
10	227—246½	4.108	4,40	163,6	189.7	0.863	0,095	85	
11	298—317	4,336	4.31	168,7	199,6	0,845	0.083	87	
			Versuch Nr. 28.	*Bornstein.*	16. IX. 21.				Fett-Eiweiß-Diät
1	vorher	[illegible]	4.?0	178,9	226,1	0,791	—	—	
2	..	[illegible]	[illegible]	173,7	218,5	0.795	0.102	111	← 100 g Lävulose
3	6—?	5,4?	[illegible]	204,8	239.8	0,854	0,109	111	
4	18—27	[illegible]	[illegible]	201,7	230.6	0,875	0.113	108	
5	29—43	5,436	4.24	207,9	231,6	0.897	0,123	105	
6	45—58½	5.652	4.09	208.3	229,1	0.909	0.125	109	
7	61—75	5,607	4,13	208,7	228,7	0,913	0.120	108	
8	78—92	5,600	4,20	211.7	248.3	0.853	0.115	108	
9	145—159	5.907	4.25	226,7	240.3	0.943	0.117	105	
10	242—259	4.612	4,20	175.2	192.7	0.909	0,096	109	
11	316—334	4.517	4,18	170,7	201,9	0,845	0,094	108	

Beiträge zum Studium der Giftwirkungen.

Über die Wirkung des Chinins und des Atoxyls auf Leberlipase.

Von

P. Rona und **R. Pavlović.**

(Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Institutes der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 14. März 1922.)

Mit 16 Abbildungen im Text.

In früheren Versuchen wurde gefunden, daß der Verlauf der Vergiftung in dem System Chinin-Invertase einer anderen Gesetzmäßigkeit gehorcht wie in dem System Chinin-Serumlipase. Im letzteren Falle ist die Giftwirkung (gemessen an dem Grad der Hemmung der Fermentwirkung) dem Logarithmus der Giftkonzentration direkt proportional; es besteht demnach eine Beziehung, wie sie etwa im *Weber-Fechner*schen Gesetz zum Ausdruck kommt. Im ersten Fall hingegen entspricht die Giftkonzentration-Hemmungskurve einer Adsorptionsisotherme, und alle anderen Beobachtungen über die Wirkungsweise des Chinins auf die Invertase sprechen ebenfalls dafür, daß wir es hier mit einem Adsorptionsvorgang zu tun haben. Bei diesen Versuchen wurde als Invertase ein mit Kaolin gereinigter wässeriger Auszug von Hefe benutzt, bei den Arbeiten mit Serumlipase das Serum der betreffenden Tierart in geeigneter Verdünnung. Es war nun naheliegend, den Unterschied in dem Verhalten der beiden Fermente demselben Gift gegenüber auf den Unterschied der Umgebung, „des Milieus", zurückzuführen, etwa in dem Sinne, daß der „Zustand" des Fermentes einmal in der wässerigen Lösung, das andere Mal im Serum für den verschiedenen Vergiftungsmodus verantwortlich wäre. Diese Annahme schien einer experimentellen Prüfung zugänglich zu sein. Man kann aus verschiedenen Organen durch wässerigen Auszug lipolytisch hochwirksame Extrakte erhalten. Der Vergleich des Verhaltens dieser außerordentlich verdünnten, die Lipase enthaltenden wässerigen Organextrakte dem Tributyrin und dem Gift gegenüber mit dem der im Blutserum befindlichen Lipase unter gleichen Bedingungen konnte möglicherweise Aufschluß über die gestellte Frage geben.

Wir benutzten zu unseren Versuchen Leberextrakte von möglichst frischen menschlichen Leichen oder von eben getöteten Tieren (Katze, Kaninchen, Rind). Der mittels Hackmaschine gewonnene Leberbrei (ca. 50 g) wurde auf einem Sieb mit physiologischer Kochsalzlösung solange durchspült, bis das Spülwasser fast frei von Blut war. Dann wurde 3—4 mal je 10 Minuten mit je ca. 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung geschüttelt, jedesmal durch Gaze filtriert. War die abfiltrierte Flüssigkeit blutfrei, so wurde der Brei noch einmal 20—30 Minuten lang mit physiologischer Kochsalzlösung geschüttelt, durch Leinwand filtriert, die Flüssigkeit mit der Hand gut abgepreßt, das Filtrat $^1/_4$ Stunde zentrifugiert, die abgegossene gelbliche Flüssigkeit mit Toluol versetzt, im Eisschrank aufbewahrt. Auf diese Weise erhielt man ein sehr wirksames, lange (bis 4 Wochen) haltbares Fermentextrakt.

Bei den Versuchen wurden stets 50 ccm gesättigte wässerige Tributyrinlösung, 3 ccm Regulator (Phosphatgemisch), 1 ccm (der entsprechend mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten) Fermentlösung angewendet. Der Verlauf der Spaltung wurde nach der stalagmometrischen Methode von *Rona* und *Michaelis* bei Zimmertemperatur verfolgt. Die H-Ionenkonzentration des Mediums wurde elektrometrisch gemessen.

I. Vorversuche untersuchten die Eigenschaften der benutzten Leberlipase (bzw. Esterase) genauer. Dabei ergab es sich, daß das Ferment in seinem Verhalten gegen Tributyrin mit dem der Serumlipase übereinstimmt. Das Optimum der Wirksamkeit liegt wie bei dieser breit im alkalischen Gebiet von p_H 7,2 bis etwa 9,0, wobei die äußerste Grenze infolge der beginnenden Alkalispaltung des Tributyrins nicht scharf festzustellen ist. Nach der saueren Seite wird die Wirkung von p_H 7,2 an allmählich abgeschwächt und hört bei p_H 5,0 auf. — Der Gang der fermentativen Spaltung läßt sich, wie bei der Serumlipase, durch die Formel einer monomolekularen Reaktion praktisch mit befriedigender Genauigkeit darstellen. — Die Zeiten gleichen Umsatzes verhalten sich umgekehrt wie die Fermentmengen. So wurden, um nur einige Beispiele zu geben, bei Fermentmengen, die sich wie 1 : 2 verhielten, für die (nach der Formel der monomolekularen Reaktion berechneten) Konstanten bzw. 0,00115 und 0,0023 gefunden, in einem anderen Versuch bzw. 0,0084 und 0,0185; bei Fermentmengen, die sich wie 1 : $^1/_2$: $^1/_3$ verhielten, waren die Konstanten bzw. 0,0322, 0,0154, 0,0108. — Einstündige Erwärmung auf 55° schwächt das Ferment beträchtlich; Zusatz von FNa hebt die Wirkung ganz auf. Durch Pergament dialysieren beide Fermentarten nicht.

Alles in allem wäre es auf Grund der erwähnten Eigenschaften nicht möglich, zwischen Serumlipase und Leberlipase (bzw. Esterase) einen Unterschied zu finden.

II. Bei der Einwirkung des Chinins auf Leberlipase wurden stets 50 ccm gesättigte Tributyrinlösung, 3 ccm Puffergemisch, 1 ccm Ferment, 1 ccm Chininlösung (angewendet wurde stets Chinin. hydrochl.) vermischt und zwar stand das Ferment (wenn nicht anders vermerkt) zuerst mit dem Gift eine Stunde, dann erst wurde der Regulator und die Tributyrinlösung zugesetzt.

Die Versuche ergaben das überraschende Resultat, daß das Chinin auf (Menschen-)Leberlipase vollkommen unwirksam ist. Während bei Menschenserumlipase bereits 0,01 mg Chinin hydrochlor. (in 50 ccm Gesamtvolumen) deutlich hemmend wirkt[1]), waren bei dem Leberferment von Menschen (und wie die weiteren Versuche zeigten, bei den

[1]) Vgl. diese Zeitschr. **118**, 215. 1921.

anderen untersuchten Tierarten) selbst mehrere Milligramme, bis 10 mg, Chinin in demselben Gesamtvolumen ohne jeden Einfluß. Mit der Chininkonzentration noch höher zu gehen, ist untunlich, da bei höheren Chininkonzentrationen die Oberflächenspannungserniedrigung der Chininbase selbst die Klarheit der Versuchsergebnisse stört.

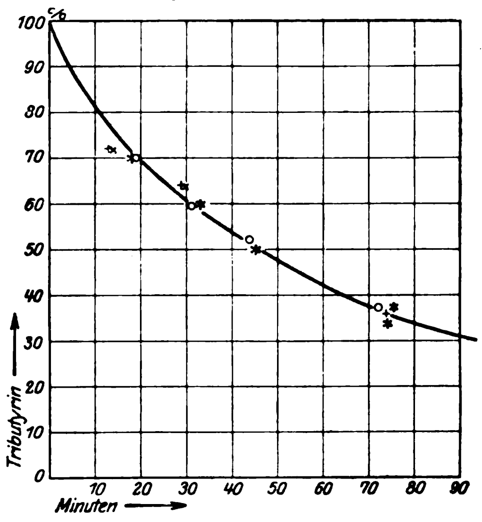


Abb. 1. + ohne Chinin; × 0,01 mg Chinin; * 0,03 mg Chinin; ○ 0,09 mg Chinin.

Die hier vorliegenden Verhältnisse zeigen die folgenden Versuche, die der übersichtlicheren Darstellung wegen z. T. graphisch wiedergegeben werden. Versuchsanordnung in allen Versuchen: 1 ccm Ferment und 1 ccm Gift (bzw. physiologische Kochsalzlösung) 1 Stunde stehengelassen, dann 3 ccm Regulator (Phosphatgemisch) und 50 ccm Tributyrin.

Versuch 1 (Abb. 1): Menschenleberextrakt. p_H 7,9. a) Ohne Chinin,

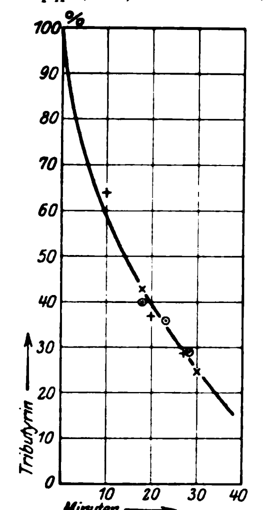


Abb. 2. + ohne Chinin; × 1 mg Chinin; ⊙ 3 mg Chinin.

Abb. 3. + ohne Chinin; × 5 mg Chinin; ⊙ 10 mg Chinin.

k = 0,01764; b) mit 0,01 mg Chinin, k = 0,01707; c) mit 0,03 mg Chinin, k = 0,01637; d) mit 0,09 mg Chinin, k = 0,01601.

Versuch 2 (Abb. 2): Menschenleberextrakt. p_H 7,86. a) Ohne Chinin, k = 0,02025 b) mit 1 mg Chinin, k = 0,01993; c) mit 3 mg Chinin, k = 0,02001.

Versuch 3 (Abb. 3): Menschenleberextrakt. p_H 7,86. a) Ohne Chinin, k = 0,03223 b) mit 5 mg Chinin, k = 0,03951; c) mit 10 mg Chinin, k = 0,03288.

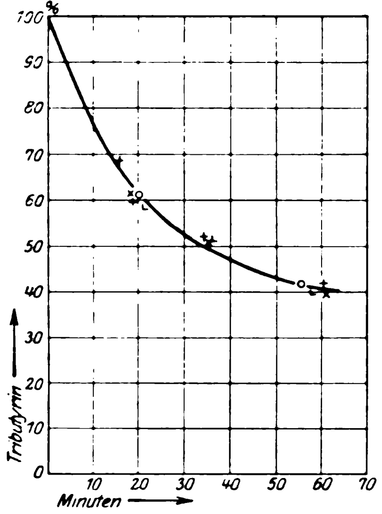


Abb. 4. + 0,03 mg Chinin; × 0,09 mg Chinin; ○ 0,81 mg Chinin; L ohne Chinin.

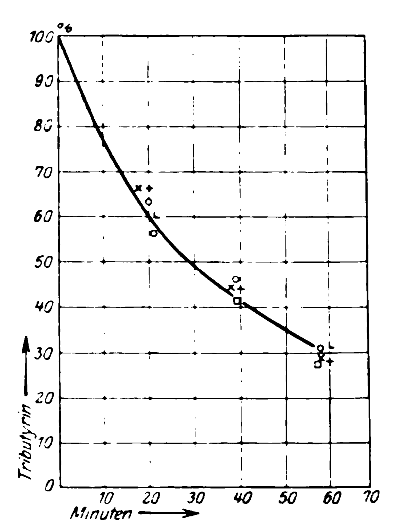


Abb. 5. L ohne Chinin; + 1 mg Chinin; × 3 mg Chinin; ○ 6 mg Chinin; □ 9 mg Chinin.

Versuch 4 (*Abb. 4*): Katzenleberextrakt. p_H 7,66. a) Ohne Chinin, $k = 0,01953$; b) mit 0,03 mg Chinin, $k = 0,01820$; c) mit 0,09 mg Chinin, $k = 0,02034$; d) mit 0,81 mg Chinin, $k = 0,02021$.

Versuch 5 (*Abb. 5*): Katzenleberextrakt. p_H 7,61. a) Ohne Chinin, $k = 0,02335$; b) mit 1 mg Chinin, $k = 0,02015$; c) mit 3 mg Chinin, $k = 0,02346$; d) mit 6 mg Chinin, $k = 0,02053$; e) mit 9 mg Chinin, $k = 0,02306$.

Versuch 6 (*Abb. 6*): Kaninchenleberextrakt. p_H 7,61. a) Ohne Chinin, $k = 0,01616$; b) mit 1 mg Chinin, $k = 0,01389$.

Abb. 6. + ohne Chinin; × 1 mg Chinin.

Die mitgeteilten Versuche illustrieren die Unwirksamkeit des Chinins zur Genüge. Vuzin hingegen, allerdings in verhältnismäßig hohen Dosen, erwies sich für die Menschenserumlipase als deutlich giftig.

Versuch 7: Menschenleberextrakt. p_H 7,77. a) Ohne Vuzin (hydrochl.), $k = 0,01781$; b) mit 1,2 mg Vuzin, $k = 0,01027$.

Versuch 8: Menschenleberextrakt. p_H 7,77. a) Ohne Vuzin, $k = 0,00881$; b) mit 1,2 mg Vuzin, $k = 0,00599$; c) mit 2,4 mg Vuzin, $k = 0$ (totale Hemmung).

III. Es war von Interesse zu prüfen, ob der Zusatz von lipolytisch wirksamem (wie auch unwirksamem) Serum zu dem lipolytisch wirksamen Leberextrakt einen Einfluß auf das Verhalten des Chinins auf die Leberlipase hat oder nicht. Man könnte sich denken, daß das Zufügen

des Serums zu dem wässerigen Leberextrakt denjenigen Zustand des Fermentes bedingt, der — wie dies im menschlichen Serum der Fall ist — die für die Angreifbarkeit des Giftes nötigen Bedingungen schafft. Daß der Leberauszug an und für sich die Wirksamkeit des Chinins nicht beeinflußt, zeigte der Versuch, bei dem man 1 mg Chinin nach dem Aufkochen mit verdünntem Leberextrakt auf Serumlipase wirken ließ; es erfolgte totale Hemmung.

Fügt man nun zur Leberlipase eine verhältnismäßig starke Chinindosis einmal in physiologischer Kochsalzlösung, das andere Mal in altem, lipolytisch bereits unwirksamem Menschenserum, so findet man keinen Unterschied in der Fermentwirkung; das Gift war in beiden Fällen unwirksam.

Versuch 9: a) 50 ccm Tributyrin + 3 ccm Phosphatgemisch (p_H 7,61) + 1 ccm altes verdünntes (1 : 5) Menschenserum. Keine Spaltung. b) 50 ccm Tributyrin + 30 ccm Phosphatgemisch + 1 ccm Katzenleberextrakt. Starke Spaltung. $k = 0{,}01436$. c) 50 ccm Tributyrin + 3 ccm Phosphatgemisch + 1 ccm Katzenleberextrakt + 1 mg Chinin (1 ccm) + 1 ccm physiologische Kochsalzlösung. (Das Ferment steht mit dem Gift zuerst eine Stunde lang, dann erst wird Regulator und Tributyrin zugefügt.) Dieselbe Spaltung wie in b), $k = 0{,}01444$. d) 50 ccm Tributyrin + 3 ccm Phosphatgemisch + 1 ccm Katzenleberextrakt + 1 mg Chinin (1 ccm) + 1 ccm Menschenserum. Dieselbe Spaltung wie in b) und c), $k = 0{,}01445$.

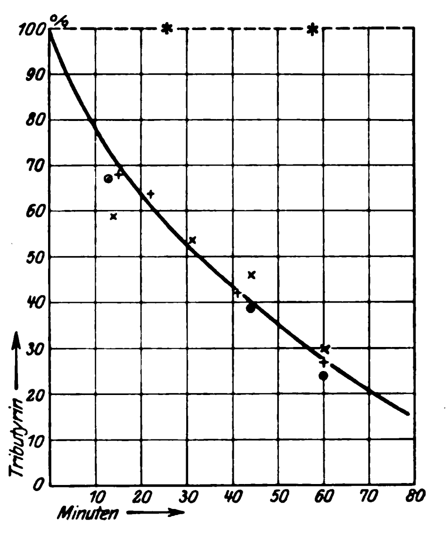


Abb. 7. a) 1 ccm inaktiv. Menschenserum unverdünnt *. b) 1 ccm Katzenleberextrakt +. c) 1 ccm Leberextrakt, 1 ccm phys. NaCl, 1 mg Chinin ×. d) 1 ccm Leberextrakt, 1 ccm Menschenserum, 1 mg Chinin ⊙.

Ob zur Leberlipase nur Chinin oder Chinin + unwirksames Menschenserum zugefügt wird, ist für die Spaltung demnach gleichgültig.

Dieselben Verhältnisse zeigt *Versuch 10, Abb. 7,* mit durch längeres Erwärmen auf 55° inaktiviertem Serum.

Auch das lipolytisch wirksame Menschenserum ändert an der Giftunempfindlichkeit der Leberlipase nichts, wie dies die folgenden Versuche klar zeigen.

Versuch 11: I. Zuerst wurden 3 Tributyrinspaltungsversuche angesetzt (p_H 7,54) a) mit 1 ccm Menschenserum, b) mit 1 ccm Katzenleberextrakt, c) mit 0,5 ccm Menschenserum + 0,5 ccm Katzenleberextrakt. Das Spaltungsvermögen war in allen 3 Fällen gleich stark. k in a) 0,01038, in b) 0,00973, in c) 0,00916. II. Wurde nun zu diesen Proben je 1 mg Chinin (in 1 ccm) zugefügt, so trat in a) totale Hemmung ein, in b) blieb die Spaltung praktisch unverändert ($k = 0{,}00915$), in c) sank sie etwa um die Hälfte ($k = 0{,}00584$).

Versuch 12 (Abb. 8): p_H 7,54. a) 1 ccm Menschenserum wurde mit 1 mg Chinin (in 1 ccm) versetzt. Sonst die übliche Anordnung. Totale Hemmung. b) 1 ccm Katzenleberextrakt mit 1 mg Chinin (in 1 ccm). Starke Spaltung. $k = 0{,}00905$. In c) und d) wurde 0,5 ccm Leberextrakt einmal [c)] mit 0,5 ccm Menschenserum und 1 mg Chinin, das andere Mal [d)] mit 0,5 ccm physiologischer NaCl-Lösung und 1 mg Chinin versetzt. Die Spaltung war in beiden Fällen praktisch gleich groß. k in c) $= 0{,}00570$, in d) $= 0{,}00612$.

Versuch 13 (Abb. 9): p_H 7,86. Es wurden zunächst 3 Versuche ohne Chinin mit a) 1 ccm Menschenleberextrakt, b) 1 ccm Menschenserum (verdünnt 1 : 2), c) mit 0,5 ccm Leberextrakt + 0,5 ccm Serum angesetzt. Die Spaltung des Tributyrins war in a) und b) fast gleich ($k_a = 0{,}01298$; $k_b = 0{,}01107$) und in c) die Summe beider Wirkungen ($k_c = 0{,}01307$). Fügt man zu 1 ccm Menschenserum 5 mg Chinin (in 1 ccm), so ist totale Hemmung, während bei Zufügen derselben

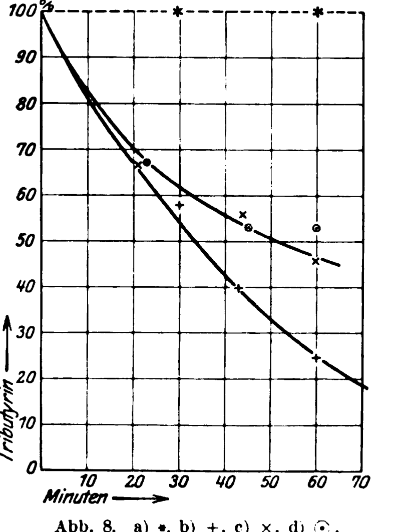


Abb. 8. a) *, b) +, c) ×, d) ⊙.

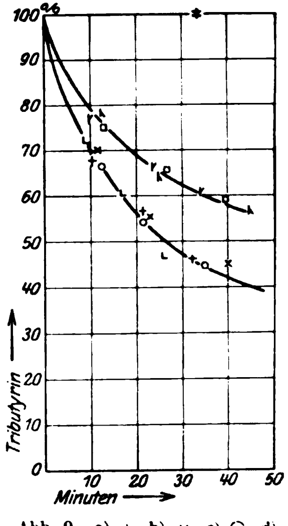


Abb. 9. a) +, b) ×, c) ○, d) Y, e) *, f) L, g) □, h) ʞ.

Chininmenge zu 1 ccm Leberextrakt die Spaltung gegenüber dem giftfreien Versuch sich nicht ändert. Vergleicht man nun die fermentative Wirkung bei folgenden Systemen: g) 0,5 ccm Leberextrakt ohne Chinin, h) 0,5 ccm Leberextrakt + 5 mg Chinin, d) 0,5 ccm Leberextrakt + 0,5 ccm Menschenserum + 5 mg Chinin (in 1 ccm), so bekommt man (innerhalb der Fehlergrenzen der Methode) gleiche Spaltungen: k in g) 0,00795; in h) 0,00898; in d) 0,00830.

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, daß das Chinin nur auf die eine Lipaseart, auf die des Menschenserums, wirkt, während die andere Lipaseart, die im Leberextrakt vorhandene, von diesem Gift nicht beeinflußt wird. Obgleich wir, wie anfangs gezeigt, in dem fermentativen Verhalten beider Lipasen keinen Unterschied auffinden können, sind wir in der Lage, die Verschiedenheit beider Fermente auf Grund ihres verschiedenen Verhaltens gegen ein Gift genau festzustellen. Wir haben somit hier einen Weg zur feineren Differenzierung gleichartiger Fermente verschiedener Herkunft vor uns, der wohl auch bei manchen

klinischen Fragestellungen (so z. B. zum Nachweis gewisser Organerkrankungen) gangbar sein dürfte.

Ferner ergaben die Versuche, daß in demselben „Milieu“, in dem die Serumlipase in ihrer Wirksamkeit von dem Chinin ganz oder stark gehemmt wird, die Leberlipase unbeeinflußt bleibt. Eine Stütze für die Auffassung, der Zustand des Fermentes spiele bei den beobachteten Erscheinungen eine Rolle,' konnte demnach nicht erbracht werden.

IV. Außer den Chininsalzen wurde in früheren Versuchen auch das Atoxyl auf seine Wirksamkeit bei der Serumlipase geprüft. Damals konnte eine starke Beeinflussung des Fermentes durch dieses Gift nachgewiesen werden. So wurde gefunden, daß bereits 0,01 mg Atoxyl in 50 ccm Gesamtvolumen eine deutliche (20—30 proz.) Hemmung der Menschenserumlipase hervorruft. Da die Leberlipase gegen Chinin so ganz anders wie die Serumlipase reagiert, so mußte untersucht werden, ob bei dem Atoxyl ähnliche Verhältnisse vorliegen. Der Versuch ergab, daß die angewandten Leberlipasen außerordentlich viel empfindlicher gegen Atoxyl sind als die Serumlipase: Bereits 0,0001 mg Atoxyl in 50 ccm Gesamtvolumen haben eine deutliche Hemmung verursacht.

Die Hemmungswirkung in ihrer Abhängigkeit von der Konzentration des Giftes zeigen folgende Versuche (Versuchsanordnung wie in den Chininversuchen):

Versuch 14 (Abb. 10): Katzenleberextrakt. p_H 7,97.

Nr.	Atoxyl in mg	Relative Giftkonzentration	$k = \frac{1}{t} \log \frac{A}{A-x}$	$h = \frac{k_0 - k}{k_0}$
1	0	0	0,05579	—
2	$1{,}10^{-4}$	1	0,03716	0,33
3	$1{,}10^{-3}$	10	0,02835	0,49
4	$1{,}10^{-2}$	100	0,02122	0,62
5	$1{,}10^{-1}$	1000	0,01297	0,75

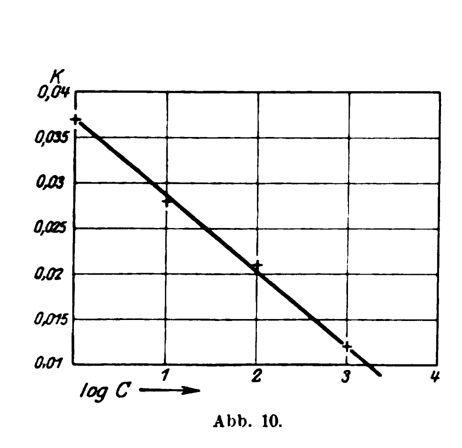


Abb. 10.

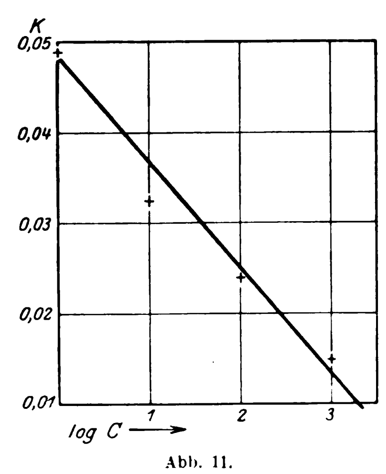


Abb. 11.

Versuch 15 (Abb. 11): **Katzenleberextrakt.** p_H **7,89.**

Nr.	Atoxyl in mg	Relative Giftkonzentration	$k = \frac{1}{t}\log\frac{A}{A-x}$	$h = \frac{k_0 - k}{k_0}$
1	0	0	0,05278	—
2	1.10^{-4}	1	0,04933	0,065
3	1.10^{-3}	10	0,03255	0,38
4	1.10^{-2}	100	0,02404	0,54
5	1.10^{-1}	1000	0,01542	0,71

Versuch 16 (Abb. 12): **Katzenleberextrakt.** p_H **7,89.**

Nr.	Atoxyl in mg	Relative Giftkonzentration	$k = \frac{1}{t}\log\frac{A}{A-x}$	$h = \frac{k_0 - k}{k_0}$
1	0	0	0,05072	—
2	$1,10^{-5}$	1	0,04818	0,05
3	1.10^{-3}	100	0,03175	0,38
4	$1,10^{-2}$	1000	0,02332	0,54
5	$1,10^{-1}$	10000	0,01529	0,70

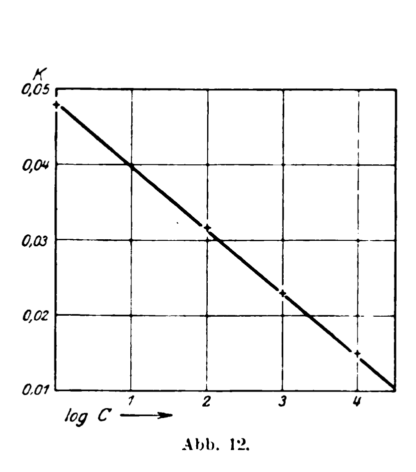


Abb. 12.

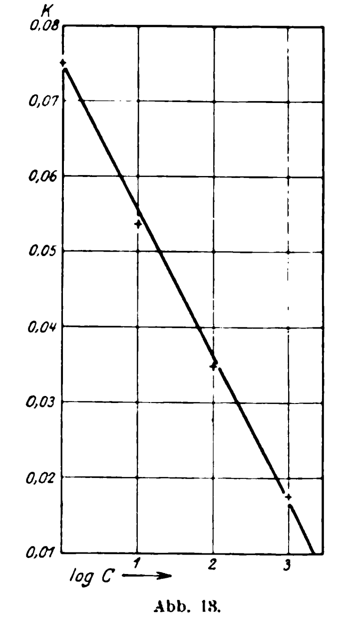


Abb. 13.

Versuch 17 (Abb. 13): **Katzenleberextrakt.** p_H **7,89.**

Nr.	Atoxyl in mg	Relative Giftkonzentration	$k = \frac{1}{t}\log\frac{A}{A-x}$	$h = \frac{k_0 - k}{k_0}$
1	0	0	0,09860	—
2	1.10^{-3}	1	0,07581	0,23
3	$1,10^{-2}$	10	0,05362	0,45
4	1.10^{-1}	100	0,03492	0,64
5	$1,10^{0}$	1000	0,01766	0,82

Versuch 18 (Abb. 14): Katzenleberextrakt. p_H 7,89.

Nr.	Atoxyl in mg	Relative Giftkonzentration	$k = \frac{1}{t} \log \frac{A}{A-x}$	$h = \frac{k_0 - k}{k_0}$
1	0	0	0,05488	—
2	$1{,}10^{-4}$	1	0,04117	0,25
3	$1{,}10^{-3}$	10	0,03349	0,39
4	$1{,}10^{-2}$	100	0,02811	0,48
5	$1{,}10^{-1}$	1000	0,01781	0,67
6	$1{,}10^{0}$	10000	0,01118	0,80

Wie die Tabellen und die Abbildungen zeigen, liegen hier dieselben quantitativen Beziehungen vor, wie bei dem System Atoxyl-Serumlipase: Bei der Zunahme der Giftkonzentration nach einer geometrischen Reihe nehmen die Geschwindigkeitskonstanten nach einer arithmetischen Reihe ab. Abgesehen von der größeren Empfindlichkeit der Leberlipase gegen das Atoxyl im Vergleich zu der der Serumlipase (an praktisch gleich stark wirksamen Fermentpräparaten gemessen), verhalten sich beide Fermente diesem Gift gegenüber gleich.

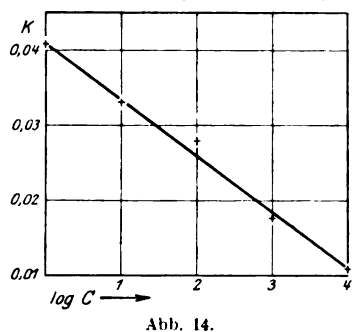


Abb. 14.

Bei der kombinierten Wirkung von Chinin und Atoxyl auf Menschenserumlipase konnte unter verschiedenen Versuchsbedingungen eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Gifte nachgewiesen werden. Wirken beide jedoch auf Leberlipase, so kommt nur die Hemmung durch Atoxyl zum Vorschein, ob außerdem noch Chinin in dem System enthalten ist, ist belanglos. Hierbei ist es auch gleichgültig, ob das Ferment zuerst längere Zeit mit Atoxyl stand und dann erst mit Chinin in Berührung kam oder umgekehrt zuerst mit Chinin und dann mit Atoxyl, oder mit Chinin und Atoxyl gleichzeitig.

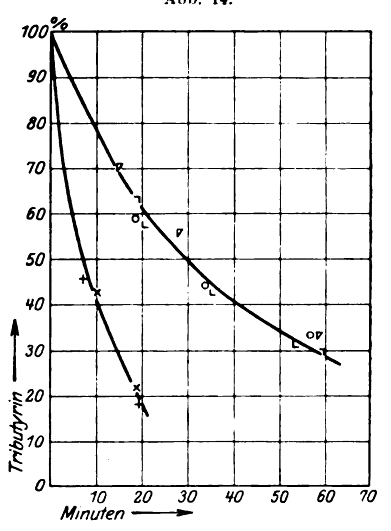


Abb. 15. a) ohne Gift (+ 2 ccm phys. NaCl-Lösung). + b) mit 1 mg Chinin (nach 1 stündigem Stehen) ×. c) mit 0,01 mg Atoxyl (nach 1 stünd. Stehen) ○. d) mit 0,01 mg Atoxyl (1/2 Stunde), dann 1 mg Chinin (1/2 Std.) L. e) mit 1 mg Chinin (1/2 Std.), dann 0,01 mg Atoxyl (1/2 Stunde) ˥. f) mit 1 mg Chinin + 0,01 mg Atoxyl (1 Std.) ▿.

Versuch 19: Menschenleberextrakt. p_H 7,86. a) Menschenleberextrakt ohne Gift, $k = 0{,}02602$; b) Menschenleberextrakt + 9 mg Chinin + 0,1 mg Atoxyl, $k = 0{,}01189$; c) Menschenleberextrakt + 0,1 mg Atoxyl, $k = 0{,}01451$.

Auch Abb. 15 zu Versuch 20 (Katzenleberextrakt, p_H 7,89) gibt die hier vorliegenden Verhältnisse gut wieder.

V. Um einen Einblick in den Vergiftungsmodus der Leberlipase durch Atoxyl zu gewinnen, mußte auch untersucht werden, ob die Vergiftung momentan erfolgt oder ob sie erst allmählich ihre maximale Höhe erreicht. Beispiele für beide Möglichkeiten sind schon in früheren Untersuchungen gefunden worden. Bei der Hemmung der Invertasewirkung durch Chinin war die Zeitdauer der Einwirkung ganz belanglos, bei den Nitrophenolen macht es für den Grad der Vergiftung einen wesentlichen Unterschied, wie lange das Ferment mit dem Gift stand, bevor es auf sein Substrat wirken konnte. Bei dem System Atoxyl-Leberlipase liegen die letzterwähnten Verhältnisse vor: Versetzt man das Ferment (Leberextrakt) mit Atoxyl und untersucht die spaltende Wirkung auf Tributyrin sofort, dann nach 15, 30, 45, 60 Minuten, nachdem Ferment und Gift zusammengestanden haben, so beobachtet man eine mit der Zeit zunehmende Hemmung der Fermentwirkung. Dies zeigen die folgenden Versuche:

Versuch 21: Katzenleberextrakt, p_H 7,82. a) Ferment 1 ccm + 50 ccm Tributyrin[1]), $k = 0,4487$; b) Ferment 1 ccm + 1 mg Atoxyl (1 ccm) + 50 ccm Tributyrin sofort zugefügt, $k = 0,4134$; c) Ferment 1 ccm + 1 mg Atoxyl (1 ccm) + 50 ccm Tributyrin nach 15 Minuten zugefügt, $k = 0,4443$; d) Ferment 1 ccm + 1 mg Atoxyl (1 ccm) + 50 ccm Tributyrin nach 30 Minuten zugefügt, $k = 0,4324$; e) Ferment 1 ccm + 1 mg Atoxyl (1 ccm) + 50 ccm Tributyrin nach 45 Minuten zugefügt, $k = 0,03524$; f) Ferment 1 ccm + 1 mg Atoxyl (1 ccm) + 50 ccm Tributyrin nach 60 Minuten zugefügt, $k = 0,02745$. Wie man sieht, betragen die Hemmungen im vorliegenden Falle in den resp. Zeiten bis 30 Minuten praktisch Null, nach 45 Minuten 21,5, nach 60 Minuten 38,7%.

Versuch 22: Katzenleberextrakt, p_H 7,82. Gift 0,001 mg Atoxyl. Anordnung wie im Versuch 21.

a) Ohne Gift, $k = 0,06476$; b) mit Gift, Tributyrin sofort, $k = 0,05138$; c) mit Gift, Tributyrin nach 15 Minuten, $k = 0,05186$; d) mit Gift, Tributyrin nach 30 Minuten, $k = 0,04657$; e) mit Gift, Tributyrin nach 60 Minuten, $k = 0,04077$. — Die Hemmungen steigen in der Beobachtungszeit von 20 auf 37%.

Versuch 23: Menschenleberextrakt, p_H 7,86. Gift 0,1 mg Atoxyl. Anordnung wie im Versuch 21.

a) Ohne Gift, $k = 0,04196$; b) mit Gift, Tributyrin nach 15 Minuten, $k = 0,02675$; c) mit Gift, Tributyrin nach 30 Minuten. Totale Hemmung. — Die Hemmung steigt von 36% (nach 15 Minuten) auf 100% (nach 30 Minuten).

Versuch 24: Menschenleberextrakt, p_H 7,86. Gift 1,0 mg Atoxyl. Anordnung wie im Versuch 21.

a) Ohne Gift, $k = 0,02720$; b) mit Gift, Tributyrin sofort, $k = 0,01329$; c) mit Gift, Tributyrin nach 15 Minuten, $k = 0,01288$; d) mit Gift, Tributyrin nach 30 Minuten, $k = 0,01042$; e) mit Gift, Tributyrin nach 60 Minuten, totale Hemmung. — Die Hemmungen betragen: Sofort 51,1%, nach 15 Minuten 52,6%, nach 30 Minuten 61,6%, nach 60 Minuten 100%.

Versuch 25: Menschenleberextrakt, p_H 7,8. Gift 1,0 mg Atoxyl. Anordnung wie im Versuch 21.

[1]) Stets mit 3 ccm Regulator.

a) Ohne Gift, $k = 0,03364$; b) mit Gift, Tributyrin sofort, $k = 0,01813$; c) mit Gift, Tributyrin nach 15 Minuten, $k = 0,01628$; d) mit Gift, Tributyrin nach 30 Minuten, $k = 0,01228$; e) mit Gift, Tributyrin nach 60 Minuten. Totale Hemmung. — Die Hemmungen betragen: Sofort 46,0%, nach 15 Minuten 51%, nach 30 Minuten 63%, nach 60 Minuten 100%.

Versuch 26: Menschenleberextrakt, p_H 7,86. Gift 1 mg Atoxyl. Anordnung wie Versuch 22.

a) Ohne Gift, $k = 0,02277$; b) mit Gift, Tributyrin sofort, $k = 0,01407$; c) mit Gift, Tributyrin nach 30 Minuten, $k = 0,00437$; d) mit Gift, Tributyrin nach 60 Minuten, totale Hemmung. — Die Hemmungen betragen: Sofort 38%, nach 30 Minuten 80%, nach 60 Minuten 100%.

VI. Sprechen diese Versuche bereits dafür, daß es sich bei der Vergiftung der Leberlipase mit Atoxyl um irreversible Vorgänge handelt, so geben die folgenden Versuche eine noch bessere experimentelle Grundlage für diese Tatsache. Bei diesen wurde das Ferment mit einer bestimmten Menge Gift zusammengebracht, einmal in hoher Konzentration, das andere Mal in etwa 25facher Verdünnung mit Tributyrinlösung, dann wurde die erste Konzentration mit der Tributyrinlösung auf die des 2. Versuches gebracht, so daß zum Schluß in beiden Reihen die Gift-Fermentkonzentration gleich groß war. Schwierigkeiten boten nur die Zeiten des Vergleiches in den beiden Versuchsreihen (*a* und *b*), da es nicht tunlich war, die „sofortige" Wirkung des Fermentes in *a* und *b* zu vergleichen, andererseits bei Feststellung der „maximalen" Wirkung in der Reihe *b* das Ferment schon 30—60 Minuten mit der gesättigten Tributyrinlösung stehen mußte, die in Reihe *a* erst nach dieser Zeit dem Ferment-Giftgemisch zugefügt wurde. Um eine Spaltung des Tributyrins während dieser Zeit zu verhindern, ließen wir das ganze System (*b*) durch Zufügen von 1 ccm n-Essigsäure bei einem für die Spaltung ungünstigen p_H stehen und brachten es nach Ablauf der erforderlichen Zeit mit n-NaOH, dann mit Phosphatgemisch auf einen passenden p_H. Zu gleicher Zeit wurde in Reihe *a* das Tributyrin dem Ferment-Giftsystem zugefügt, so daß die Spaltung des Tributyrins in beiden Reihen nach den verschiedenen Vorstadien zu gleicher Zeit unter denselben Bedingungen begann. Natürlich wurde in Vorversuchen geprüft, ob die Essigsäure in den angewandten Konzentrationen in der in Betracht kommenden Zeit schädlich auf das Ferment wirkt, was nicht der Fall ist. Es wurden auch stets 2 Kontrollen ohne Gift angesetzt, einmal mit, einmal ohne die entsprechende Menge Natriumacetat. Die Unterschiede der fermentativen Spaltung in den beiden Kontrollversuchen lag innerhalb der Fehlergrenzen der Methode.

Die auf diese Weise angestellten Versuche ergaben stets die stärkere Giftwirkung in denjenigen Versuchen, in welchen das Gift eine Zeitlang in höherer Konzentration mit dem Ferment stand. Die nachträgliche Verdünnung auf die der Reihe *b* hat die Giftwirkungen der beiden Reihen nicht gleich gemacht.

Versuch 27: Menschenleberextrakt, p_H 7,86. Gift 1 mg Atoxyl. In Reihe a) stehen 1 ccm Leberextrakt + 1 mg Atoxyl (1 ccm) 60 Minuten, dann werden 50 ccm Tributyrin und 5 ccm Regulator zugefügt. In Reihe b) stehen 1 ccm Ferment, 1 mg Atoxyl (1 ccm), 50 ccm Tributyrinlösung und 1 ccm n-Essigsäure 60 Minuten, dann werden 1 ccm n-NaOH und 3 ccm Regulator zugefügt. Die Hemmung ist in a) total, in b) 75%.

Versuch 28: Versuchsanordnung wie im Versuch 27. Hemmung in a) total, in b) 67%.

Versuch 29: Versuchsanordnung wie im Versuch 27. Hemmung in a) total, in b) 55%.

Ganz in demselben Sinne sprechen *Dialysenversuche.* Bei diesen zeigte es sich, daß die Ferment-Giftverbindung durch Dialyse nicht getrennt werden kann. Vorversuche, bei denen zunächst 5 ccm unverdünnter Menschenleberextrakt in Schleicher-Schüll-Hülsen gegen 20 ccm destilliertes Wasser oder physiologische Kochsalzlösung dialysierte, ergaben zunächst, daß die Außenflüssigkeit nicht spaltet und die Spaltung der Innenflüssigkeit nicht nachweislich abnahm. Auch bei 28stündigem Dialysieren in Schleicher-Schüll-Hülsen gegen fließendes und dann wiederholt gewechseltes destilliertes Wasser war keine Änderung der Fermentwirkung der Innenflüssigkeit zu beobachten.

Abb. 16. a) ohne Gift vor der Dialyse +. b) 0,1 mg Atoxyl vor der Dialyse ×. c) ohne Gift nach der Dialyse ○. d) 0,1 mg Atoxyl nach der Dialyse L.

Bei den Giftversuchen dialysierten 5 ccm Menschenleberextrakt in *a*) mit 1 ccm dest. Wasser, in *b*) mit 1 ccm Atoxyl (0,1 mg) versetzt gegen sehr häufig gewechseltes destilliertes Wasser. k vor der Dialyse in *a*) 0,02077, in *b*) 0,01673, nach der Dialyse in *a*) 0,02180, in *b*) 0,01344. Die (in diesem Falle schwache) Giftwirkung war also nach der Dialyse sogar etwas stärker, wohl weil das Gift länger mit dem Ferment in Berührung stand (Versuch 30).

Die Verhältnisse in einem ganz gleich angesetzten Versuch mit Katzenleberextrakt zeigt die Abb. 16 (Versuch 31).

VII. Die eben mitgeteilten Zeit-Verdünnungsversuche können ohne Berücksichtigung der tatsächlich vorhandenen Verhältnisse leicht eine „schützende" Wirkung des Tributyrins vortäuschen, da in Versuchen mit Änderung der Reihenfolge der einzelnen Bestandteile des Ferment-Giftsystems das nachträglich zugefügte Gift in einer schwächeren Konzentration auf das Ferment wirkt. Andererseits steht bei nachträglich zugefügtem Tributyrin das Ferment bereits mehr oder weniger lange mit dem Gift, wodurch — falls man die Zeitwirkung unbeachtet läßt —

der Kontrollversuch eine noch schwächere Giftwirkung zeigt. Da wir in früheren Versuchen bei der Wirkung des Atoxyls auf Serumlipase eine solche Schutzwirkung des Tributyrins annehmen zu können glaubten, mußten diese Angaben einer Revision unterzogen werden. Dabei ergab es sich, daß die Vergiftung, die nicht momentan verläuft, sondern erst allmählich die maximale Höhe erreicht, auch hier irreversibel ist, und die stärkere Vergiftung durch eine höhere Giftkonzentration durch nachträgliche Verdünnung nicht auf den (geringeren) Grad gebracht werden kann, der bei der schon von vornherein schwächeren Verdünnung besteht. Dies zeigen die folgenden Versuche:

Bei diesen stand in Reihe a) 1 ccm Katzenserum (1 : 3) mit 1 mg Atoxyl (in 1 ccm) bzw. 0, 30 und 60 Minuten (Nr. a_1, a_2, a_3), dann wurden 5 ccm Regulator und 50 ccm Tributyrinlösung zugefügt. In Reihe b) stand das Gemisch, bestehend aus 1 mg Atoxyl (1 ccm), 50 ccm Tributyrinlösung, 1 ccm n-Essigsäure, 1 ccm Katzenserum, bzw. 0, 30, 60 Minuten (Nr. b_1, b_2, b_3), dann wurden 1 ccm n-NaOH und 3 ccm Regulator zugefügt.

Versuch 32: Katzenserum, p_H 7,86. Hemmungen in Reihe a) nach 0 Minuten (und natürlich auch nach 30 und 60 Minuten) 100%, in Reihe b) nach 0 Minuten 39,2%, nach 30 Minuten 54,5%, nach 60 Minuten 100%.

Versuch 33: Katzenserum, p_H 7,86. (Hier 0,7 mg Atoxyl.) Hemmungen in Reihe a) nach 0 Minuten 75%, nach 30 Minuten 80%, nach 60 Minuten 100%; in Reihe b) nach 0 Minuten 61%, nach 30 Minuten 77%, nach 60 Minuten 84%.

Versuch 34: Katzenserum, p_H 7,86. Hemmungen in Reihe a) nach 0 Minuten (und 30 und 60 Minuten) 100%; in Reihe b) nach 0 Minuten 60%, nach 30 Minuten 68%, nach 60 Minuten 100%.

Mit diesen Befunden stimmt es auch überein, daß auch hier, wie im System Leberlipase-Atoxyl die Gift-Fermentverbindung durch Dialyse nicht getrennt werden kann. In diesem Falle konnte auch das Chinin in dieser Richtung geprüft werden. Es verhielt sich wie das Atoxyl.

Versuch 35: 4 ccm Menschenserum, versetzt in a) mit 1,5 ccm destilliertem Wasser, in b) mit 1,5 mg (in 1,5 ccm) Chinin. hydrochl., in c) mit 1,0 mg Atoxyl (in 1,5 ccm) dialysierten in Schleicher-Schüll-Hülsen 24 Stunden lang gegen fließendes destilliertes Wasser. Die gefundenen Werte für *k* waren vor der Dialyse in a) 0,0060, in b) 0,00382, in c) 0,00270; nach der Dialyse in a) 0,0061, in b) und c) war totale Hemmung der Fermentwirkung.

Versuch 36: 5 ccm Menschenserum, versetzt in a) mit 2,0 ccm destilliertem Wasser, in b) mit 1,0 mg Atoxyl (in 2 ccm) dialysierten in Schleicher-Schüll-Hülsen 24 Stunden lang gegen fließendes destilliertes Wasser. Die gefundenen Werte für *k* waren vor der Dialyse in a) 0,00859, in b) 0,00473; nach der Dialyse in a) 0,00749, in b) totale Hemmung.

Versuch 37: 5 ccm Menschenserum, versetzt in a) mit 1,0 ccm destilliertem Wasser, in b) mit 1,0 mg Chinin. hydrochl. (in 1 ccm), dialysierte 24 Stunden lang gegen fließendes destilliertes Wasser. Die gefundenen Werte für *k* waren vor der Dialyse in a) 0,01776, in b) 0,01216; nach der Dialyse in a) 0,01907, in b) 0,01386.

Diese Beispiele zeigen, daß es sich auch bei der Vergiftung der Serumlipase durch Atoxyl und Chinin um irreversible Vorgänge handelt, so daß bei der Feststellung der hemmenden Giftwirkung die Reihenfolge

in der die einzelnen Bestandteile des Systems miteinander in Berührung gebracht werden, wie auch die Zeit der Giftwirkung auf das Ferment in Betracht gezogen werden müssen.

Zusammenfassung.

1. Die fermentativen Eigenschaften der Leberlipase, geprüft an dem Verhalten gegen Tributyrin, sind identisch mit denen der Blutserumlipase.

2. Gegen Chinin verhalten sich die beiden Fermentarten jedoch ganz verschieden. Während auf Serumlipase bereits 0,01 mg (in 50 ccm Gesamtvolumen) Chinin hemmend wirkt, ist die Leberlipase selbst gegen 10 mg Chinin (unter denselben Bedingungen) vollkommen unempfindlich.

3. Mischt man beide Fermentarten, so kann die Resistenz bzw. die Empfindlichkeit gegen das Gift nicht von einer auf die andere Fermentart übertragen werden. Man ist so in der Lage, im Gemisch beide Fermentarten nachzuweisen und ihre Wirkung einzeln quantitativ zu verfolgen.

4. Gegen Atoxyl ist die Leberlipase viel empfindlicher als Serumlipase. Bereits 0,0001 mg Atoxyl (in 55 ccm Gesamtvolumen) üben eine hemmende Wirkung auf das Ferment aus.

5. Der Verlauf der Vergiftung gehorcht derselben Gesetzmäßigkeit wie der der Serumlipasevergiftung: Bei Zunahme der Giftkonzentration nach einer geometrischen Reihe nehmen die Geschwindigkeitskonstanten der Tributyrinspaltung nach einer arithmetischen Reihe ab.

6. Die Vergiftung der Leberlipase durch Atoxyl und die der Serumlipase durch Atoxyl und durch Chinin ist ein irreversibler Vorgang.

Über die Wirkung von Sublimat, Phenol und Chinin auf Hefe.

Von

Georg Joachimoglu.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 15. März 1922.)

Mit 21 Abbildungen im Text.

Sollen naturwissenschaftliche Beobachtungen zu Naturgesetzen zusammengefaßt werden, so muß die Richtigkeit der beobachteten Tatsache über jeden Zweifel erhaben sein. Verschiedene experimentelle Ergebnisse der Physiologie (z. B. das *Pflüger*sche Zuckungsgesetz) und Pharmakologie hat man als Beweise für das sog. *Arndt-Schulz*sche biologische Grundgesetz herangezogen. Das Gesetz besagt, daß kleine Mengen eines Giftes umgekehrt wirken wie große, kleine erregend, große lähmend. Die experimentellen Grundlagen für die Richtigkeit dieses Satzes hat hauptsächlich *Hugo Schulz*[1]) zu geben versucht. Dieser Forscher fand, daß Sublimat und andere Gifte (Jod, Brom, arsenige Säure, Chromsäure, Salicylsäure, Ameisensäure) in schwachen Konzentrationen (bei $HgCl_2$ 1 : 500000 bis 1 : 700000) die Tätigkeit der Hefe gegenüber Kontrollen ohne Giftzusatz erheblich steigern. Es wurde dabei nicht die produzierte CO_2 gemessen, sondern es wurde der durch die CO_2-Entwicklung ausgeübte Druck mittels eines Hg-Manometers registriert. Die in den Tabellen aufgeführten Zahlen geben in Zentimetern die Wege an, die von den Quecksilbersäulen der Manometer innerhalb 15 Minuten zurückgelegt wurden[2]). Später hat *H. Schulz*[3]) einen Apparat zur graphischen

[1]) Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **108**, 423. 1887 und Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **42**, 517. 1888.

[2]) In dem bekannten Buch von *H. Euler* und *P. Lindner* (Chemie der Hefe und alkoholischer Gärung, Leipzig 1915, S. 320) werden die Versuche von *H. Schulz* erwähnt und eine Tabelle aus seinen Protokollen wiedergegeben. Dabei haben die Verfasser übersehen, daß die *Schulz*schen Zahlen nicht Kubikzentimeter CO_2 bedeuten, sondern Druckdifferenzen, die am Manometer abgelesen wurden. Die Autoren weisen mit Recht daraufhin, daß die Untersuchungen von *H. Schulz* einer Nachprüfung bedürftig sind.

[3]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **120**, 51. 1907.

Registrierung von Gärungsvorgängen beschrieben. Wir haben uns vielfach mit der Konstruktion eines ähnlichen Apparates beschäftigt, ohne jedoch bis heute zu einem befriedigenden Ergebnis zu gelangen. Bei allen Konstruktionen ist prinzipiell zu beachten, daß Gummischläuche für CO_2 nicht ganz dicht sind.

Abgesehen davon ist bei der Messung des durch die Kohlensäure entwickelten Druckes nach *H. Schulz* zu berücksichtigen, daß bei Druckzunahme die Menge der in der Flüssigkeit gelösten CO_2 zunimmt. Sie ist proportional diesem Druck. Da in den verschiedenen Ansätzen der Druck nun wechselt, ist die Menge der gelösten CO_2 nicht gleich. Es soll damit nicht gesagt werden, daß die von *H. Schulz* angewandte Methode falsch sei. Bei der großen Bedeutung, die man vielfach den *Schulz*schen Versuchen beigemessen hat und den weitgehenden Schlußfolgerungen, die daraus gezogen worden sind, war eine Nachprüfung derselben notwendig.

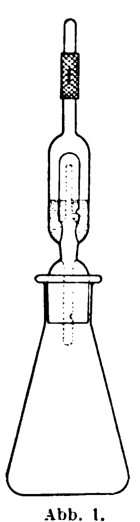


Abb. 1.

In einer früheren Arbeit[1]) konnten wir die Angaben von *H. Schulz* bezüglich der arsenigen Säure nicht bestätigen. Während *H. Schulz* angibt, daß bei einer Konzentration von 1 : 400 000 As_2O_3 die Tätigkeit der Hefe im Sinne einer Steigerung der Kohlensäureproduktion beeinflußt wird, konnten wir bei entsprechenden Konzentrationen diese Wirkung nicht beobachten.

Im folgenden sollen Versuche mitgeteilt werden, die wir zur Prüfung der gleichen Frage mit Sublimat, Carbolsäure und Chinin ausgeführt haben. Die Versuchsanordnung war eine sehr einfache: Die Gärung ging im *Buchner*schen Gärkölbchen vor sich. Das Gärkölbchen (vgl. Abb. 1) faßt 80—90 ccm und trägt eingeschliffen ein Meisslventil, das mit konzentrierter H_2SO_4 gefüllt ist. Dieses Ventil trägt einen Gummischlauch mit einem seitlichen Schlitz, der den Austritt von CO_2, aber nicht den Eintritt von Luft gestattet. Oben wird der Schlauch durch einen kurzen Glasstab abgeschlossen. Das Kölbchen kann bequem mit einer chemischen Wage gewogen werden, und die Gewichtsabnahme entspricht der bei der Gärung entwickelten CO_2. Um die Fehler, die durch den Temperaturabfall beim Wägen bedingt sind, möglichst auszuschalten, haben wir die Versuche bei gewöhnlicher Temperatur (18—21°) vorgenommen.

Über die Fehlergrenzen der Methode haben wir uns zunächst durch eine Reihe von Versuchen ohne Giftzusatz unterrichtet. Nachstehend geben wir 2 derartige Normalversuche wieder. Je 3 Kölbchen wurden mit 20 ccm 20 proz. Zuckerlösung, 2 ccm 5 proz. Hefeaufschwemmung

[1]) Vgl. diese Zeitschr. **79**, 144. 1917.

(Preßhefe) und 18 ccm Leitungswasser beschickt. Die Menge der entwickelten Kohlensäure nach 1, 4, 5, 23, 26, 29 Stunden ist aus folgenden Tabellen ersichtlich.

Tabelle I.

Nr. des Versuchs	Sacharose 20% ccm	Hefeaufschwemmung 50% ccm	Wasser ccm	CO_2 in mg nach Stunden					
				1	4	5	23	26	29
1	20	2	19	4	29	39	330	384	428
2	20	2	19	4	29	39	338	394	437
3	20	2	19	4	32	42	330	383	428

Tabelle II.

Nr. des Versuchs	Sacharose 20% ccm	Hefeaufschwemmung 50% ccm	Wasser ccm	CO_2 in mg nach Stunden				
				2	4	6	23	26
1	20	2	18	3	11	22	217	260
2	20	2	18	4	14	28	223	268
3	20	2	18	3,6	12,6	25	217	265

Obwohl alle Gärkölbchen gleiche Mengen von Zucker und Hefe und das gleiche Volumen Wasser enthalten, sehen wir doch, daß die produzierte Kohlensäure in den Gärkölbchen nicht die gleiche ist. Sie schwankt z. B. in dem Versuch, den Tabelle II wiedergibt, nach 4 Stunden zwischen 11 und 14 mg, nach 5 Stunden zwischen 22 und 28 mg und nach 26 Stunden zwischen 260 und 268 mg Kohlensäure. Auch in anderen Versuchen erhielten wir gleiche Resultate. Wegen Raumersparnis wollen wir auf ihre Wiedergabe verzichten. Die Versuche lehren, daß aus Unterschieden von etwa 6—8 mg keine weitgehenden Schlüsse zu ziehen sind. Hätten wir z. B. in dem Gärkölbchen Nr. 2 Tabelle II Sublimat in ganz geringen Mengen zugesetzt, so wären wir bei Nichtbeachtung des oben Gesagten zu dem Schluß gekommen, daß hier das Sublimat eine Steigerung der Kohlensäureproduktion hervorgerufen hat.

In den nächsten Versuchen mit Giftzusätzen haben wir für jede zu prüfende Konzentration 3 Kölbchen angesetzt und diese in der Reihenfolge wie Tabelle III angibt, zur Wägung gebracht, um auch den Faktor Zeit, der zur Wägung nötig ist, auszuschalten, denn es ist ja klar, daß, während man das eine Kölbchen wägt, in dem anderen die Gärung weitergeht. Wir erhielten auf diese Weise Zahlen für die 3 Kontrollen und die 3 Kölbchen mit Giftzusatz. Tabelle III gibt einen Versuch wieder bei einer $HgCl_2$-Konzentration von 1 : 50 000.

Auch hier sehen wir, daß wir für die 3 Kontrollen und die 3 Kölbchen mit Sublimatzusatz nicht die gleichen Zahlen erhalten haben. Für die 3 Kontrollen schwanken z. B. die entwickelten Milligramm CO_2

Tabelle III.

Nr. des Versuchs	Sacharose 20% ccm	Hefeaufschwemmung 50% ccm	Sublimat 1:1000 ccm	Wasser ccm	CO_2 in mg nach Stunden 1	2	5	6	23
1	30	4	—	16	3	9	41	52	360
2	30	4	1,0	15	1	3	7	9	105
3	30	4	—	16	4	11	43	54	358
4	30	4	1,0	15	2	4,5	10	14	102
5	30	4	—	16	4	11	40	50	352
6	30	4	1,0	15	2	5	8	12	100

nach 5 Stunden zwischen 40 und 43, nach 23 Stunden zwischen 352 und 360 mg.

Rechnet man die Mittelzahlen der ermittelten CO_2-Mengen für die 3 Kontrollen und die 3 Gärgemische mit Sublimat aus und trägt sie in ein Koordinatensystem ein, und zwar in die Abscisse die Zeit in Stunden und in die Ordinate die Milligramm CO_2, so erhält man die in Abb. 2 wiedergegebene Kurve 1.

Die Kurve zeigt uns, daß bei dieser Konzentration das Sublimat, wie zu erwarten war, eine erhebliche Abnahme der CO_2-Produktion bedingt. Wir haben noch $HgCl_2$-Konzentrationen 1:66000, 1:100000, 1 : 125 000, 1 : 250 000, 1 : 330 000, 1 : 400 000, 1 : 500 000, 1 : 600 000, 1 : 750 000, 1 : 1 200 000 geprüft. Von einer Wiedergabe der ermittelten Zahlen wollen wir absehen und nur die nach der für Kurve 1 oben angegebenen Methode erhaltenen Kurven zum Abdruck bringen. Die in den Abb. 3—12 wiedergegebenen Kurven zeigen uns, daß bis zu einer Konzentration von 1 : 125 000 die Hefegärung durch das Sublimat eine Hemmung erfährt. Bei den anderen Konzentrationen fallen die Kurven der Kontrollen und der Ansätze mit Sublimat fast zusammen. Insbesondere konnte eine Beschleunigung der Hefegärung durch das Sublimat niemals beobachtet werden.

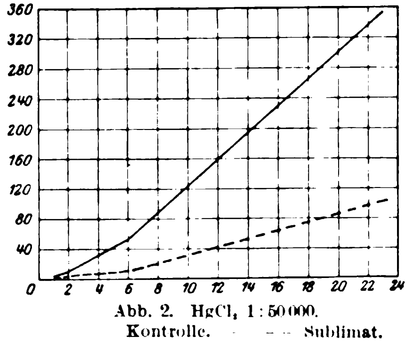


Abb. 2. $HgCl_2$ 1:50000.
Kontrolle. - - - Sublimat.

Die Versuche mit *Chinin*[1]), die bei Konzentrationen des salzsauren Salzes von 1 : 360, 1 : 412, 1 : 675, 1 : 1250, 1 : 2500, 1 : 5000 angestellt wurden, haben bei einer Konzentration von 1:360 bis 1:675 eine Hemmung der Gärung, bei den höheren Konzentrationen aber keine nennenswerte Wirkung gezeigt. Wir verzichten auch hier auf die Wiedergabe

[1]) Vgl. *H. Schulz*, Zentralbl. f. Physiol. **34**, 415. 1919.

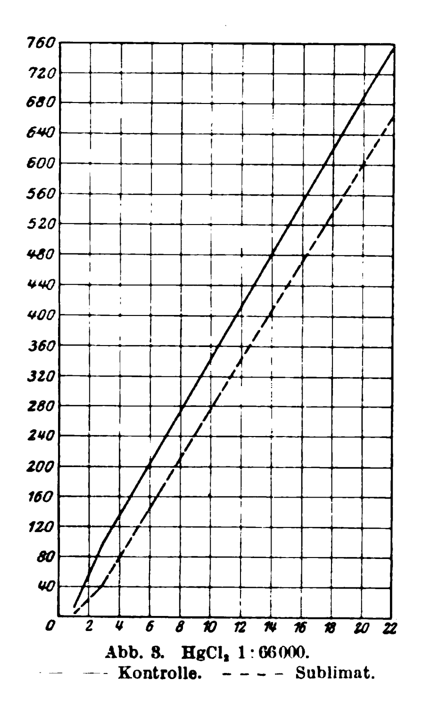


Abb. 3. $HgCl_2$ 1 : 66000.
——— Kontrolle. - - - - Sublimat.

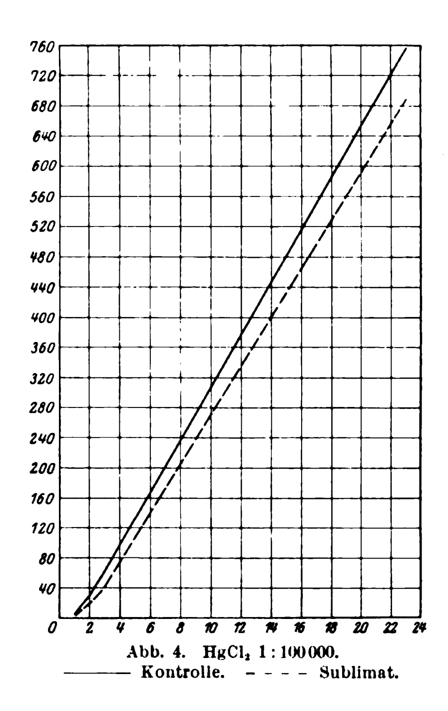


Abb. 4. $HgCl_2$ 1 : 100000.
——— Kontrolle. - - - - Sublimat.

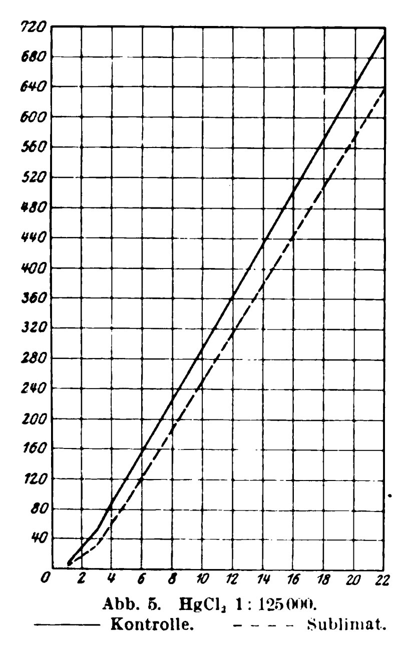


Abb. 5. $HgCl_2$ 1 : 125000.
——— Kontrolle. - - - - Sublimat.

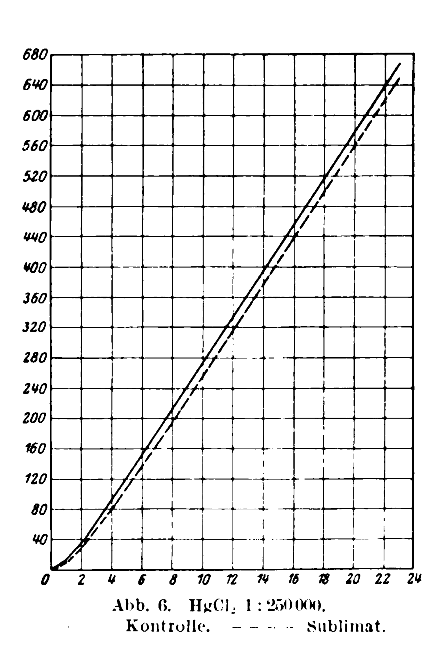


Abb. 6. $HgCl_2$ 1 : 250000.
——— Kontrolle. - - - - Sublimat.

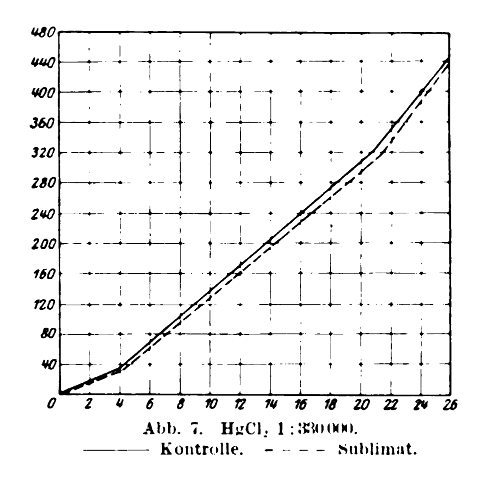


Abb. 7. $HgCl_2$ 1:330000.
——— Kontrolle. - - - - Sublimat.

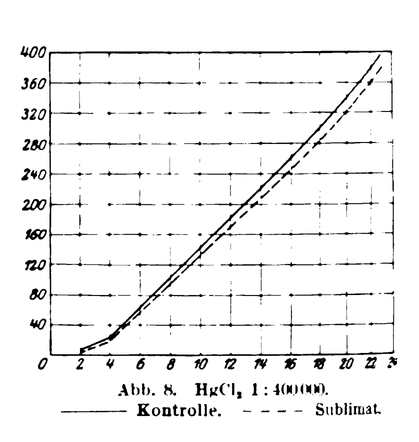


Abb. 8. $HgCl_2$ 1:400000.
——— Kontrolle. - - - - Sublimat.

der erhaltenen Zahlen und geben nur die entsprechenden Kurven wieder, wobei wir noch einmal darauf hinweisen wollen, daß für jede Chininkonzentration gleichzeitig 3 Versuche angestellt wurden und parallel 3 Kontrollen. Auch hier entsprechen die Kurven den Mittelzahlen von 3 Versuchen. *Vgl. Abb. 13—18.*

Die Versuche mit *Phenol* haben zu ähnlichen Resultaten geführt. Bei einer Konzentration von 1 : 1000 eine gewisse Hemmung der Gärung, bei einer Konzentration von 1 : 5000 und 1 : 10 000 kaum eine nennenswerte Wirkung. *Vgl. Abb. 19—21.*

Die Versuche zeigen, daß es uns nicht gelungen ist, die Resultate von *H. Schulz* zu bestätigen. Weder arsenige Säure, noch Sublimat,

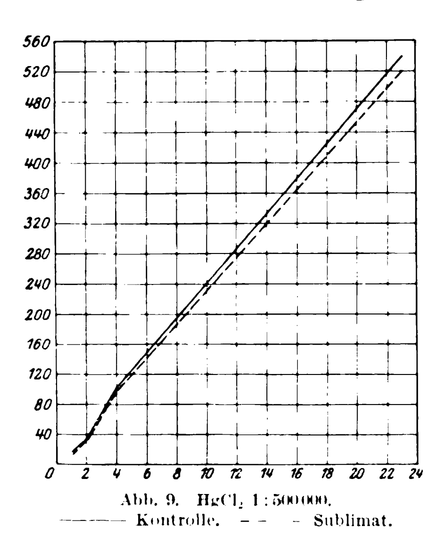


Abb. 9. $HgCl_2$ 1:500000.
——— Kontrolle. - - - Sublimat.

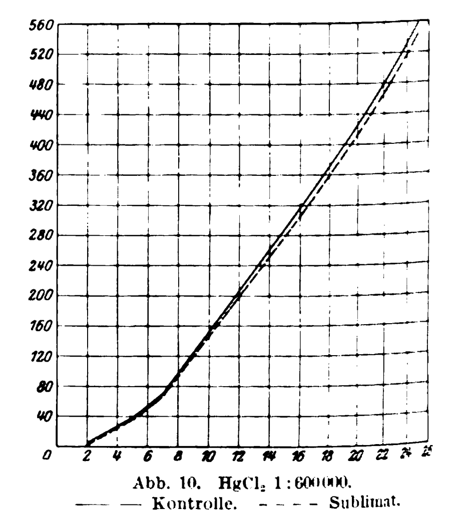


Abb. 10. $HgCl_2$ 1:600000.
——— Kontrolle. - - - - Sublimat.

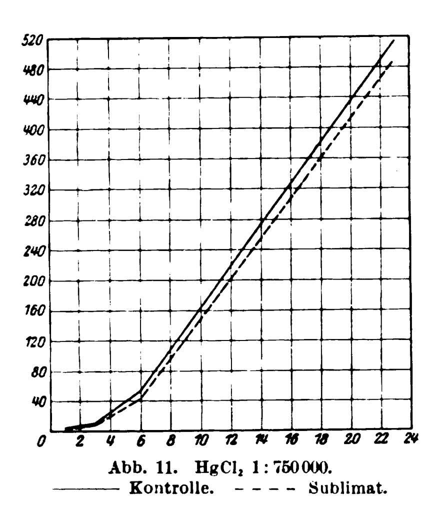


Abb. 11. $HgCl_2$ 1 : 750000.
——— Kontrolle. - - - - Sublimat.

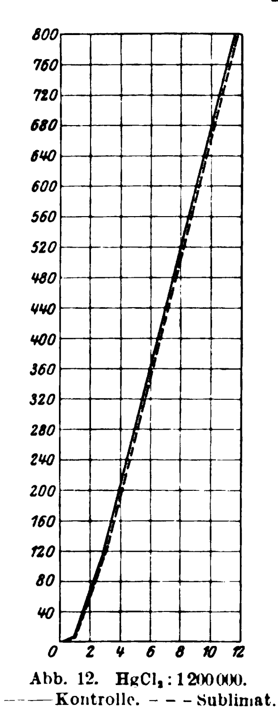


Abb. 12. $HgCl_2$: 1200000.
——— Kontrolle. - - - Sublimat.

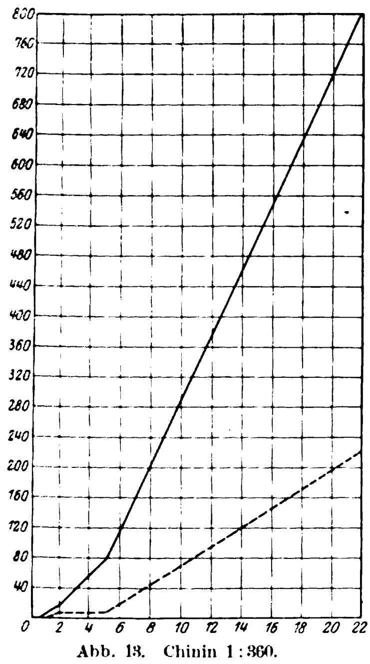


Abb. 13. Chinin 1 : 360.
——— Kontrolle. - - - - Chinin.

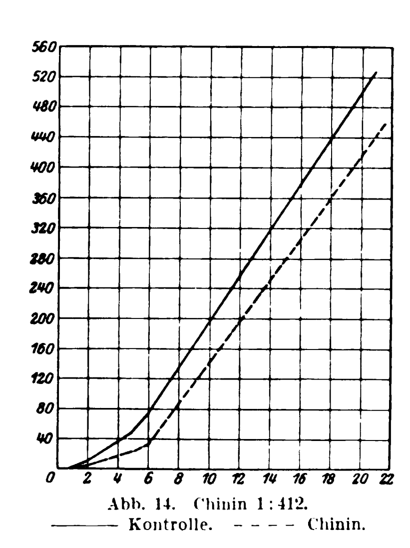


Abb. 14. Chinin 1 : 412.
——— Kontrolle. - - - - Chinin.

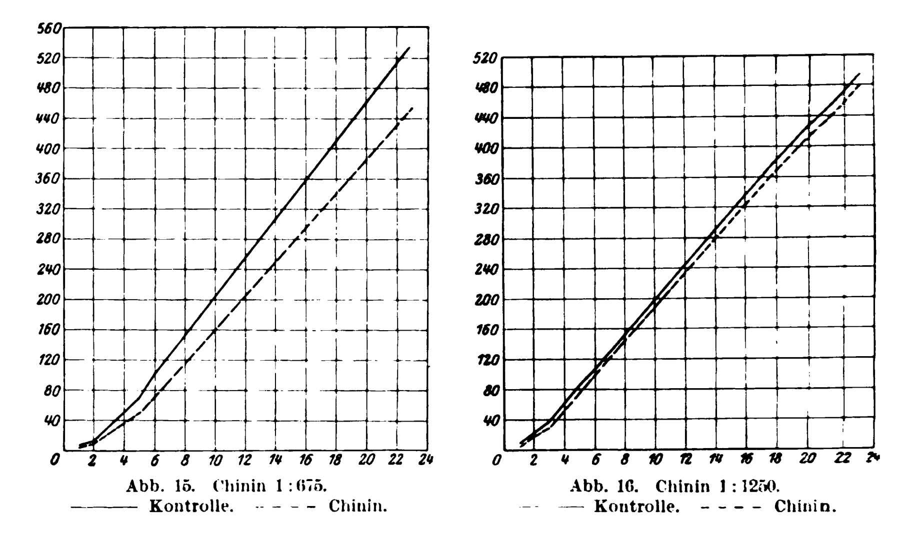


Abb. 15. Chinin 1:675.
——— Kontrolle. - - - - Chinin.

Abb. 16. Chinin 1:1250.
——— Kontrolle. - - - - Chinin.

noch Chinin, noch Phenol zeigen in schwachen Konzentrationen eine Beschleunigung der Gärung.

Was nun das *Arndt-Schulz*sche Gesetz anbelangt, so ist richtig, daß die Wirkung einiger Gifte diesem Gesetz entspricht. Die lähmende Wirkung großer Strychnindosen und die erregende kleiner Dosen kann in Form eines Vorlesungsversuchs demonstriert werden. Bei vielen anderen Giften vermissen wir jedoch eine derartige Wirkung. Vielfach ist auch die Beurteilung, ob wir es bei der Wirkung auf höhere Tiere mit einer

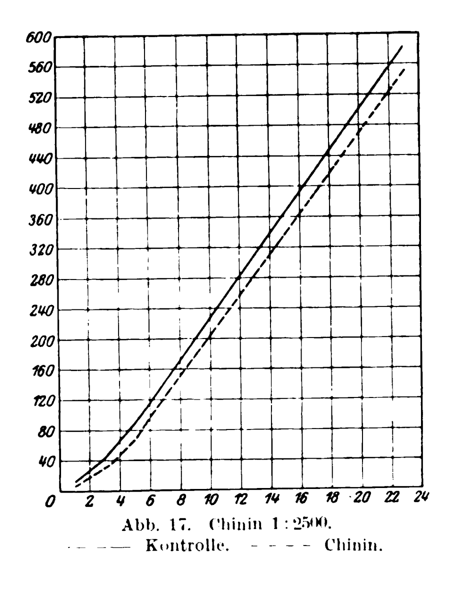


Abb. 17. Chinin 1:2500.
——— Kontrolle. - - - - Chinin.

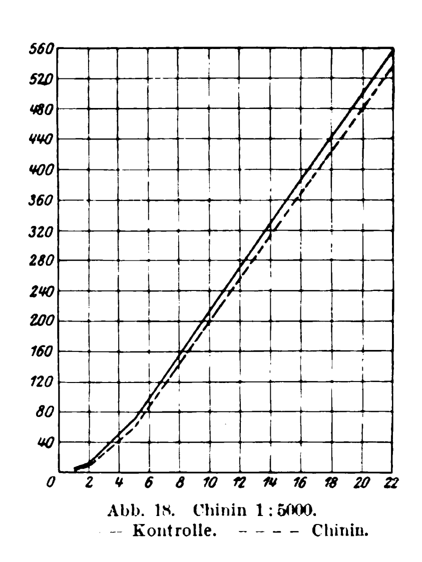


Abb. 18. Chinin 1:5000.
——— Kontrolle. - - - - Chinin.

Erregung oder einer Lähmung zu tun haben, schwierig. Das was als Erregung imponiert, ist zuweilen durch eine Beseitigung von Hemmungen bedingt. Die Analyse der Wirkung wäre allerdings bei einem einfachen Objekt, wie es die Hefe ist, leichter. Wenn es uns gelingen könnte, bei allen Giften, die die Hefegärung hemmen, durch kleine Dosen eine Steigerung derselben hervorzurufen, so wäre damit das *Arndt-Schulz*sche Gesetz in hohem Maße wahrscheinlich geworden. Arsenige Säure, Sublimat, Chinin, Phenol lassen eine derartige Wirkung vermissen. Anderseits

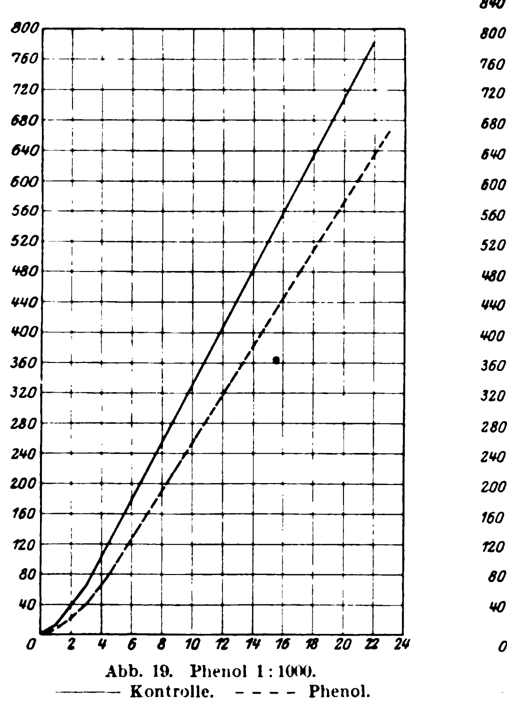


Abb. 19. Phenol 1 : 1000.
——— Kontrolle. - - - - Phenol.

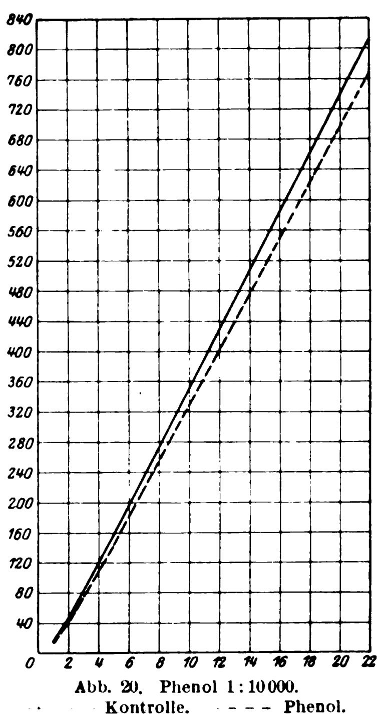


Abb. 20. Phenol 1 : 10000.
Kontrolle. - - - Phenol.

gibt es echte Aktivatoren der Gärung, wie *Neuberg*[1]) u. a. gefunden haben. Wenn wir also auch *nur* die Wirkung auf Hefe betrachten, so können wir von einer gesetzmäßigen Wirkung je nach der Konzentration im Sinne des *Arndt-Schulz*schen Gesetzes nicht sprechen. Viel komplizierter sind die Verhältnisse, wenn wir die Wirkung eines Giftes auf höhere Lebewesen ins Auge fassen, und viel kompliziertere Zusammenhänge haben wir bei der Betrachtung der Wirkung von Körpern, deren chemische Zusammensetzung nicht bekannt ist. Man hat ja auch die Wirkung von Eiweißkörpern bei der parenteralen Eiweißtherapie durch

[1]) Diese Zeitschr. **88**, 145. 1918.

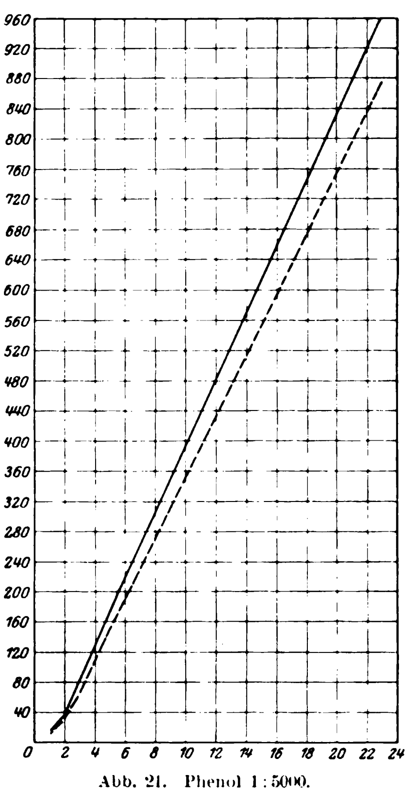


Abb. 21. Phenol 1:5000.
——— Kontrolle. - - - - Phenol.

das *Arndt-Schulz*sche Gesetz erklären wollen. Wir geben uns einer Täuschung hin, wenn wir auf Grund eines Gesetzes, das höchstens die Bezeichnung Arbeitshypothese verdient, nunmehr glauben, die Wirkung aller Gifte diesem Gesetz unterordnen zu können. *Nernst*[1]) sagt mit Recht: „Die biologischen Gesetze, wie etwa diejenigen der Entwicklungslehre oder der Vererbungslehre, sind qualitativen Charakters oder doch nur bedingt einer quantitativen Behandlung fähig. Trotz ihrer großen Bedeutung können wir sie kaum als Naturgesetze bezeichnen, sondern eher als Regeln, bei denen man auch angesichts von Ausnahmen ein Auge zudrückt."

Bei dem *Arndt-Schulz*schen Gesetz sind die Ausnahmen zu groß, als daß wir berechtigt sind, etwa von einer *Arndt-Schulz*schen Regel zu sprechen.

[1]) Rektoratsrede Berlin, Okt. 1921, S. 7.

Über die Wirkung von Placentaextrakten auf die Speichelsekretion.

Von

Jiro Kosakae (Mukden).

(Aus der Experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität in Berlin.)

(Eingegangen am 15. März 1922.)

In meiner Arbeit über die Kombination von Uterusmitteln[1]) habe ich gefunden, daß ein enteiweißtes und cholinfreies Placentaextrakt Uteruskontraktionen hervorruft, und daß diese Wirkung durch gleichzeitige Gabe von Pituglandol verstärkt wird. Diese Arbeit knüpft an die Untersuchungen von *Guggisberg*[2]) an, der zuerst die Placenta als wehenerregendes Organ erkannt hat. *Fellner*[3]) hat dann später ein alkoholisches Placentaextrakt als wehenerregend befunden. *Fuchs*[4]) sah, daß Preßsäfte und Extrakte aus der Placenta hemmend auf die Pendelbewegungen des Uterus einwirken. *Ludwig*[5]) hat dann in der Wirkung von Substanzen der reifen Placenta die Ursache für den Geburtsbeginn gesehen.

Als ich in dem Pharmakologischen Institut in Bern bei Professor *Bürgi* das von ihm mir übergebenen Placentaextrakt auf seine wehenerregende Wirkung untersuchte, machte ich die Beobachtung, daß die Tiere, denen das Extrakt subcutan oder intravenös injiziert worden war, eine Pupillenverengerung, Speichelfluß und Tränensekretion erkennen ließen. Diese Beobachtung habe ich nun weiter verfolgt und will im folgenden über meine diesbezüglichen Versuche berichten.

Daß das Placentaextrakt nach seiner subcutanen oder intravenösen Injektion die Speicheldrüsen zur Sekretion treibt, ist deshalb beachtenswert, weil es bisher nicht gelungen ist, aus Körpermaterial Substanzen herzustellen, die in dieser Richtung wirken, während doch für alle anderen Verdauungsdrüsen aus verschiedenen Organen sich Sekretine gewinnen ließen. Um das Resultat meiner Versuche gleich vorweg zu nehmen, will ich sagen, daß das Placentaextrakt zwar auch nur eine geringe, aber doch sicher nachweisbare Wirkung auf die Speicheldrüsen hat. Im Anschluß an diese Versuche habe ich auch Placentaextrakt

und Pituglandol kombiniert injiziert, ohne daß dadurch die Wirkung irgendwie verstärkt wurde. Meine Versuche stellte ich einmal mit salzsaurem Hydrolysat der Placenta an, außerdem aber auch mit dem Placentaextrakt, das ich schon in Bern benutzt hatte.

Die Versuchsanordnung war derart, daß Hunden eine permanente Fistel der Glandula submaxillaris und sublingualis nach der *Pawlow*schen Methode angelegt wurde und daß an der Fistel die Speichelsekretion nach den Injektionen beobachtet ward.

Herstellung des Extraktes.

Extrakt Nr. 1. Trocknen der ausgewaschenen Placenta bei 80° ca. 24 Stunden lang, das Gewicht der getrockneten Substanz war 20 g, Hydrolysieren mit 100 ccm konzentrierter Salzsäure (5 mal soviel als die getrocknete Substanz) 8 Stunden lang bei 100°, Abdestillieren der Salzsäure im Vakuum, Neutralisieren mit Natronlauge, Wasserzusatz: Gesamtmenge 200 ccm; 1 ccm Extrakt entspricht 0,1 g Trockensubstanz Placenta.

Extrakt Nr. 2. Die Herstellungsweise wie bei Nr. 1; 1 ccm entspricht 0,1 g Placentatrockensubstanz.

Extrakt Nr. 3. Trocknen bei 80° ca. 24 Stunden, dann noch 4 Stunden lang auf 130° erhitzt, sonstige Herstellung wie die erste. Konzentration: 1 ccm Extrakt entspricht 0,1 g Trockenplacenta. Extrakte Nr. 2 und 3 stammen aus den gleichen Placenten.

Extrakt Nr. 4. 3 proz. Placentaextrakt „Ciba“ Basel.

Experimente.

Hund A. Speichelfisteloperation 6. I.

Injektionen.

1. 9. I. 12^h 5 ccm Extrakt Nr. 1 intravenös. 10 Minuten nach der Injektion ist die Wirkung wahrzunehmen. Dauer 10 Minuten.

2. 9. I. 12^h 40′ 5 ccm Extrakt Nr 1 intravenös. 10 Minuten nach der Injektion beginnt die Sekretion. 20 Minuten nach der Injektion sehr deutlich. Ganze Dauer der vermehrten Sekretion über eine halbe Stunde.

3. 10. I. 11^h 30′ 5 ccm Extrakt Nr. 1 intravenös. 10 Minuten nach der Injektion ist die Sekretion wahrzunehmen.

4. 10. I. 12^h 30′ 5 ccm Extrakt Nr. 1 intravenös. Die Wirkung wie oben.

5. 12. I. 12^h 30′ 5 ccm Extrakt Nr. 1 intravenös. 12 Minuten nach der Injektion ist die Sekretion wahrzunehmen. Die Dauer der Sekretion ca. 10 Minuten lang.

6. 12. I. 3^h 15′ 5 ccm Extrakt Nr. 1 subcutan. 15 Minuten nach der Injektion ist die Wirkung wahrzunehmen. Das Tier ist sehr unruhig.

7. 16. I. 12^h 25′ 5 ccm Extrakt Nr. 1 intravenös. 3 Minuten nach der Injektion ist nur eine kleine Menge Sekret aus der Fistel gekommen. 12 Minuten nach der Injektion vermehrt sich die Sekretion, aber nicht sehr deutlich. Die Dauer der Sekretion $^3/_4$ Stunden.

8. 16. I. 1^h 25′ 5 ccm Extrakt Nr. 1 subcutan. Die Wirkung ist nach 10 Minuten wahrzunehmen.

9. 25. I. 1^h 40′ 10 ccm Extrakt Nr. 2 subcutan, die Wirkung nach wenigen Minuten wahrnehmbar, aber nicht sehr deutlich.

10. 25. I. 5^h 30′ 10 ccm Extrakt Nr. 2 intravenös. Die Wirkung ist mäßig stark. Die Speichelmenge beträgt in $^3/_4$ Stunden 2 ccm.

11. 28. I. 11^h 32′ 10 ccm Extrakt Nr. 3 subcutan. Die Wirkung ist nicht wahrzunehmen.

12. 23. II. 1^h 30′ Kombination (1 ccm Pituglandol, 9 ccm Extrakt Nr. 2) intravenös. 2 Minuten nach der Injektion zeigt sich die Sekretion.

13. 23. II. 3^h 50′ Kombination 1 ccm Pituglandol und 9 ccm Extrakt Nr. 2 subcutan. Die Wirkung mäßig. Die Gesamtmenge der Sekretion durch die beiden Injektionen beträgt 1,2 ccm.

14. 2. III. 1^h 15′ Kombination 1 ccm Pituglandol und 9 ccm Extrakt Nr. 2 intravenös. Bald zeigt sich die Wirkung, aber nicht stark.

15. 2. III. 3^h 25′ Kombination 1 ccm Pituglandol und 9 ccm Extrakt Nr. 2 subcutan. Wirkung wahrnehmbar, aber nicht deutlich.

Hund B. Operation 28. I.

1. 22. II. 1^h 10′ 1 ccm Pituglandol und 9 ccm Extrakt Nr. 2 intravenös. 2 Minuten nach der Darreichung zeigt sich Sekretion. Menge in 30 Minuten beträgt 0,8 ccm.

2. 22. II. 4^h 50′ Kombination 1 ccm Pituglandol und 9 ccm Extrakt Nr. 2 subcutan. Bald nach der Injektion zeigt sich die mäßig starke Wirkung. Sekret in einer halben Stunde beträgt 0,5 ccm.

3. 1. III. 4^h Kombination 1 ccm Pituglandol und 2 ccm Extrakt Nr. 4 intravenös. Die Wirkung vorhanden, aber nicht deutlich.

4. 1. III. 4^h 20′ Kombination 1 ccm Pituglandol und 3 ccm Extrakt Nr. 4 subcutan. Die Wirkung kommt bald zur Anschauung.

5. 1. III. 4^h 30′ Kombination 1 : 3 subcutan. Bald zeigt sich die Wirkung. Die Gesamtmenge der Sekrete beträgt auf 3 Injektionen 1,2 ccm.

Schluß.

Wie schon oben gesagt, geht aus meinen Versuchen hervor, daß sowohl das von mir bei 100° hergestellte Placentaextrakt wie auch das Placentaextrakt „Ciba“ eine mäßige Sekretinmenge für die Speicheldrüsen enthält, daß aber diese Sekretinwirkung durch Temperaturen von 130° verloren zu gehen scheint. Eine Verstärkung der Wirkung durch gleichzeitige Pituglandolgabe war nicht nachweisbar.

Literatur.

1) *J. Kosakae,* Über Kombination von Uterusmitteln. Diss. Bern 1921. — 2) *Guggisberg,* Zeitschr. f. Geburtsh. u. Gynäkol. 1910 u. 1914. — 3) *Fellner,* Arch. f. Gynäkol. 1913. — 4) *Fuchs,* Zeitschr. f. Geburtsh. u. Gynäkol. 1914. — 5) *Ludwig,* Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäkol. 1919.

Beiträge zur Synthese der Fette (Glyceride).

Von

C. Amberger und **K. Bromig.**

(Mitteilung aus der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in München.)

(Eingegangen am 17. März 1922.)

Über die Zusammensetzung des Gänsefettes haben wir bereits an anderer Stelle[1]) in eingehender Weise berichtet. Wir konnten neben anderem feststellen, daß im Gänsefett 2 Glyceride von der Zusammensetzung eines Stearodipalmitins enthalten sind und zwar eines mit Schmelzpunkt 63° und ein solches mit 57,5°. Von anderer Seite wurde nach kurzen Berichten, die Referate eines Vortrages darstellen, die Ansicht vertreten, daß das bei 63° schmelzende schwerlöslichste Glycerid des Gänsefettes ein Palmitodistearin ist. Wir haben daraufhin die Ergebnisse unserer diesbezüglichen Abhandlung nochmals in eingehendster Weise nachgeprüft und müssen auf dem von uns eingenommenen Standpunkt beharren.

Bisher ist allerdings in den Speisefetten von *Bömer*[2]) und von dem einen[3]) von uns lediglich nur ein Stearodipalmitin vom Schmelzpunkt 57—58° aufgefunden worden. Der Schmelzpunktunterschied der beiden aus dem Gänsefett isolierten Stearodipalmitine war unserer Ansicht nach nur dadurch zu erklären, daß Isomere eines und desselben Körpers vorlagen.

Um einen Einblick in die Struktur dieser und anderer isomeren Glyceriden zu erhalten, stellten wir diese Glyceride synthetisch dar und verglichen die synthetisch erhaltenen Produkte mit den aus den Fetten isolierten.

Für die Synthese der gemischten Triglyceride kamen folgende Methoden in Betracht:

1. Die Gewinnung von Glyceriden aus Halogenhydrinen beim Erhitzen mit Seifen auf höherer Temperatur (Grün).

---

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **42**, 193. 1921.
[2]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **25**, 321. 1913.
[3]) *Amberger*, l. c. **26**, 85. 1913.

2. Die Darstellung auf Grund von Arbeiten von *E. Fischer*, *M. Bergmann* und *H. Bärwind*[1]) über Acetonglycerin bzw. Acylacetonglycerin oder aus Jodhydrin und

3. Die Gewinnung von unsymmetrischen Triglyceriden aus 2-Phenyl-5-methylol-oxazolidin[2]).

Wir haben in unserer ersten Abhandlung das Stearodipalmitin nach der von *Grün* und *Weyrauch* angegebenen Vorschrift auf dem Wege dargestellt, daß wir von α-Dichlorhydrin ausgegangen sind und ließen darauf Stearinsäurechlorid einwirken. Es entsteht bekanntlich ein Stearodichlorhydrin. Unter der Voraussetzung, daß bei Einwirkung von Natriumpalmitat auf diese Verbindung die Reaktion glatt verläuft, war anzunehmen, daß das synthetisch erhaltene Produkt mit Schmelzpunkt 63° ein β-Stearo-αα-Dipalmitin ist. Auf dieser Voraussetzung, die auch wir zugrunde legten, beruhen viele Schlüsse über die Struktur der Glyceride. Die bisherige Annahme, daß das im Molekül schon vorhandene Acyl seine Stellung beibehält, wenn andere Gruppen einwirken, ist hinfällig geworden; es können nach *Emil Fischer* Umlagerungen stattfinden. Die Frage, ob das von uns nach obiger Art synthetisch dargestellte Glycerid vom Schmelzpunkt 63° wirklich die β-Verbindung ist, ist somit zweifelhaft geworden.

Um feststellen zu können, ob bei dieser Synthese Umlagerungen stattfinden, haben wir dieses Glycerid über Acetonglycerin dargestellt. Auch nach *Grün* und *Fr. Wittka* ist die Konstitution der direkt aus Acetonglycerin und anderen Acetonverbindungen dargestellten Glyceride über jeden Zweifel erhaben.

Diese Synthese beruht auf der Darstellung von Acetonglycerin, Acylierung derselben, Abspaltung des Acetons und Veresterung der freien Hydroxydgruppen mittels Säurechloride.

Wir haben im gegebenen Fall Acetonglycerin hergestellt, auf dieses Stearinsäurechlorid einwirken lassen, das Stearylacetonglycerin gespalten und das gebildete Monostearyl mit Palmitinsäurechlorid behandelt. Der entstandene Körper müßte ein α-Stearo-αβ-dipalmitin sein. Dieser so gewonnene Körper zeigt einen Schmelzpunkt 63,5° und war also somit identisch mit dem aus Gänsefett erhaltenen unlöslichsten Glycerid, welches bei 63,0° schmolz.

Durch diese Synthese war somit auf Grund der vorliegenden Untersuchungen erwiesen, daß das im Gänsefett aufgefundene schwerlöslichste Glycerid vom Schmelzpunkt 63,0° ein α-Stearo-αβ-dipalmitin sein mußte.

Wir stellten weiterhin die β-Verbindung dar und schlugen hierzu den ebenfalls von *E. Fischer* gezeigten Weg ein. Wir gingen von α-Jod-

[1]) B. **53**, 1589. 1920.
[2]) B. **54**, 936. 1921.

hydrin aus, ließen darauf zunächst Palmitinsäurechlorid einwirken und erhielten so ein bei 42° schmelzendes $\alpha\beta$-Dipalmitin-α-jodhydrin. Von diesem Körper mußten wir für die weitere Synthese zu einem Dipalmitin durch Abspaltung des Halogens mit Silbernitrit gelangen. Nun ist hierbei interessant, daß beim Austausch des Halogens gegen Hydroxyd mittels Silbernitrits aus den $\alpha\beta$-Diacylhalogenhydrin durch Umlagerung der Acyle ein $\alpha\alpha$-Diacylglycerid entsteht. Wir mußten somit durch Einwirkung von Silbernitrit auf $\alpha\beta$-Dipalmitin-α-jodhydrin ein Dipalmitin erhalten. Das so dargestellte $\alpha\alpha$-Dipalmitin schmolz bei 69,5°. In diesem $\alpha\alpha$-Dipalmitin veresterten wir nun die in β-Stellung stehende freie Hydroxylgruppe mit Stearinsäurechlorid; da bei der eingehaltenen niedrigeren Reaktionstemperatur eine Umlagerung der Acyle nicht stattfindet, mußte so ein β-Stearo-$\alpha\alpha$-dipalmitin entstehen. Dieser Körper schmolz bei 58,5° und es ist nach obigen Ausführungen anzunehmen, daß das in den natürlichen Fetten vorkommende Stearo Dipalmitin vom Schmelzpunkt 57—58° im β-Stearo-$\alpha\alpha$-dipalmitin darstellt.

Vergleicht man nun die Ergebnisse der ersten Synthese (Natriumpalmitat und β-Stearo-$\alpha\alpha$-dichlorhydrin) mit den Ergebnissen der *Fischer*schen Synthese über Acetonacylglycerin bzw. $\alpha\beta$-Acyl-α-jodhydrin und Silbernitrit, so ergibt sich folgendes:

Nach den Schlußfolgerungen der ersten Synthese ist das bei 63,0° schmelzende Glycerid ein β-Stearo-$\alpha\alpha$-dipalmitin, nach der *Fischer*schen Synthese stellt der bei 63,5° schmelzende Körper die α-Verbindung dar; da feststeht, daß nach der Synthese über Acetonglycerin kein anderer Körper erhalten werden kann als die α-Verbindung, so müssen bei der Darstellung des Stearodipalmitins aus β-Stearo-$\alpha\alpha$-chlorhydrin und Natriumpalmitat hinsichtlich der Acyle Umlagerungen eingetreten sein. Wir sind auch imstande, das experimentell zu beweisen.

Wir gingen von α-Jodhydrin aus und ließen nun im Gegensatz zu der vorigen Synthese Natriumstearat auf $\alpha\beta$-Dipalmitin-α-jodhydrin einwirken und erhielten nun einen bei 59,5° schmelzenden Körper. Dieser Körper zeigte somit in bemerkenswerter Weise denselben Schmelzpunkt, der primär bei der Synthese nach *Grün*[1]) und auch von uns gefunden wurde. Der Schmelzpunkt dieser Substanz lag bezeichnenderweise zwischen den Schmelzpunkten der synthetisch dargestellten Körper, des α- und β-Stearodipalmitins. Es war schon aus dem Schmelzpunkt anzunehmen, daß kein einheitlicher Körper vorlag, sondern eine Mischung; daß dies der Fall war, konnte dadurch nachgewiesen werden, daß er durch fraktionierte Krystallisation in die α- und β-Form zerlegt werden konnte.

Nach diesen Feststellungen haben wir die Synthese auch auf andere Glyceride ausgedehnt und sind dabei zu folgenden Ergebnissen gekommen.

[1]) *Grün-Weyrauch*, Diss. Zürich 1911.

Nach *Bömer*[1]) und *Limprich* ist das in Hammeltalg aufgefundene, bei 63,3° schmelzende Palmitodistearin die β-Verbindung. Sie versuchten diesen Körper synthetisch darzustellen, um so den Beweis der Konstitution zu erbringen.

Für die Synthese dieses aus dem Hammeltalg isolierten Körpers gingen *Bömer* und *Limprich* von αα-Dichlorhydrin aus und stellten aus ihm nach den von *Guth* in der von *Kreis* und *Hafner* abgeänderten Form das αα-Distearin in der Weise dar, daß sie Kaliumstearat in verschiedenen Mengenverhältnissen auf αα-Dichlorhydrin einwirken ließen. Das so erhaltene αα-Distearin zeigte einen Schmelzpunkt von 77,8°. Dieses Distearin erhitzten sie nun zur Einführung der Palmitinsäure an Stelle der noch freien Hydroxylgruppe 4 Stunden lang auf 190—205° bei einem Druck von 70—80 mm mit dieser Säure. Der erhaltene Körper schmolz bei 63,3° und wurde in der betreffenden Abhandlung als β-Verbindung des Palmitodistearins bezeichnet.

Wir sind auf einem anderen Weg der Synthese zu anderen Resultaten gekommen.

Zunächst stellen wir die α-Verbindung her.

Für die Darstellung des α-Palmito-αβ-distearins ließen wir auf das über Acetonglycerin erhaltene α-Monopalmitin Stearinsäurechlorid bei einer Temperatur unter 30° einwirken. Als Endprodukt bekamen wir einen bei 63° schmelzenden Körper, der auf Grund der Synthese als ein α-Palmito-αβ-distearin anzusprechen ist.

Es ist also die bemerkenswerte Tatsache zu verzeichnen, daß nach dem von *Bömer* und *Limprich* angewandten *Guth*schen Verfahren der bei 63,3° schmelzende Körper die β-Verbindung darstellen soll, während auf dem von *Emil Fischer* und *M. Bergmann* gezeigten Weg, den wir eingeschlagen haben, über Acetonglycerin die bei 63° schmelzende Verbindung als die α-Form angesprochen werden muß. Wir können uns diese Verschiedenheiten nur dadurch erklären, daß unter den Versuchsbedingungen, die *Bömer* und *Limprich* gewählt haben (190 bis 205°), eine Umlagerung der Acyle eingetreten sein muß, und das von diesen erhaltene Palmitodistearin die α-Verbindung darstellt.

Die β-Verbindung versuchten wir nun aus α-Jodhydrin über αβ-Distearin-α-jodhydrin, Abspalten des Halogens mit Silbernitrit und Verestern der in β-Stellung stehenden Hydroxylgruppe mit Palmitinsäurechlorid zu gewinnen. Der bei dieser Synthese erhaltene Körper schmolz bei 67,9° und ist auf Grund der Synthese als die β-Verbindung des β-Palmito-αα-distearins anzusehen.

Der symmetrische Bau des letzteren würde auch zu dem höheren Schmelzpunkt und der geringeren Löslichkeit passen.

---

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **25**, 356. 1913.

Demnach ist entgegen den bisherigen Literaturangaben das in Fetten aufgefundene Palmitodistearin mit dem Schmelzpunkt 68° als die β-Verbindung (= β-Palmito-αα-distearin) anzusehen, während das aus den natürlichen Fetten isolierte bei 63° schmelzende Palmitodistearin die α-Verbindung (= α-Palmito-αβ-distearin) darstellt.

Wir benutzten diese Synthesen zur Gewinnung weiterer Glyceride, insbesondere zur Darstellung von α-Palmito-αβ-diolein und Oleodistearin. In beiden Fällen gingen wir zur Gewinnung der α-Verbindung von Acetonglycerin aus und ließen auf das erhaltene α-Monopalmitin bzw. α-Monoolein die entsprechenden Säurechloride (Ölsäure- bzw. Stearinsäurechlorid) bei möglichst niedriger Temperatur einwirken. In einem Fall bekamen wir α-Palmito-αβ-diolein, eine dickflüssige ölige Masse, welche zwischen 10—12° schmolz, im anderen Falle α-Oleo-αβ-distearin, einen gelblichen Körper vom Schmelzpunkt 42°. Von dem Oleodistearin versuchten wir auch die β-Form darzustellen aus αβ-Stearo-α-jodhydrin, doch erhielten wir kein einheitliches Endprodukt. Die Ölsäure scheint hier nur sehr schwer verestert zu werden; der so gewonnene Körper zerfiel bei der fraktionierten Krystallisation in αα-Distearin und Ölsäure.

Praktischer Teil.

Darstellung von α-Stearo-αβ-dipalmitin.

$C_3H_5(C_{18}H_{35}O_2)\cdot(C_{16}H_{31}O_2)_2$.

Zur Darstellung des α-Stearo-αβ-dipalmitins gingen wir von Acetonglycerin aus. Dieses stellten wir nach dem von *Emil Fischer* und *E. Pfähler*[1]) angegebenen Verfahren her.

Acetonglycerin.

$$\begin{array}{lllll} CH_2OH & CH_3 & CH_2OH & & \\ | & & | & & \\ CHOH + & CO = & CHO & \diagdown\!\!\diagup CH_3 + H_2O\,. & \\ | & & | \quad C & & \\ CH_2OH & CH_3 & CH_2O & \diagup\!\!\diagdown CH_3 & \end{array}$$

33 g wasserfreies Glycerin wurden mit 200 ccm reinem Aceton, in dem 2 g trockenes HCl eingeleitet wurden, vermischt. Das durch Destillation erhaltene Rohprodukt wurde nochmals zur Reinigung im Vakuum destilliert. Die Ausbeute betrug 31,5 g (ungefähr 66% der Theorie).

Stearylaceton.

$$\begin{array}{llll} CH_2OH & & CH_2OOCC_{17}H_{35} & \\ | & & | & \\ CHO \diagdown\!\!\diagup CH_3 + C_{17}H_{35}COCl = & & CHO \diagdown\!\!\diagup CH_3 + HCl\,. & \\ | \qquad C & & | \qquad C & \\ CH_2O \diagup\!\!\diagdown CH_3 & & CH_2O \diagup\!\!\diagdown CH_3 & \end{array}$$

[1]) B. 53, (II), 1607. 1920.

Die Darstellung von Stearylacetonglycerin geschah nach der ebenfalls von *Emil Fischer* gezeigten Methode[1]). 5,26 g des oben erhaltenen Acetonglycerins lieferten bei Anwendung von 4,7 g Chinolin und 10 g Stearinsäurechlorid 9,7 g Stearylacetonglycerin. Dasselbe zeigte den gleichen Schmelzpunkt wie *Emil Fischer* angab; es schmolz bei 40,6°.

8 g von diesem Stearylacetonglycerin wurden zur Gewinnung des

α-Monostearyls.

$$\begin{array}{lcl} CH_2OOCC_{17}H_{35} & & CH_2OOCC_{17}H_{35} \\ CHO\diagdown\diagup CH_3 & \rightarrow & CHOH \\ \quad C & & \\ CH_2O\diagup\diagdown CH_3 & & CH_2OH \end{array}$$

mit konzentrierter Salzsäure in ätherische Lösung versetzt. Das abgespaltene Monostearyl stimmte hinsichtlich des Schmelzpunktes mit dem von *Emil Fischer* erhaltenen Präparat überein; es schmolz bei 80,9° (74,9°). Ausbeute 6,8 g = 97,16% der Theorie.

α-Stearo-αβ-dipalmitin.

$$\begin{array}{lcl} CH_2OOCC_{17}H_{35} & & CH_2OOCC_{17}H_{35} \\ | & & | \\ CHOH & + 2\,C_{15}H_{31}COCl = & CHOOCC_{15}H_{31} + 2\,HCl\,. \\ | & & | \\ CH_2OH & & CH_2OOCC_{15}H_{31} \end{array}$$

Die Darstellung dieses Körpers nach diesem Verfahren ist neu. 2,71 g α-Monostearin wurden unter schwachem Erwärmen in 10 ccm trockenem Chloroform gelöst und mit einer Mischung von 2,7 g Chinolin und 5 g Palmitinsäurechlorid unter Umschütteln allmählich versetzt. Bei Zugabe des Säurechlorides trübte sich die Flüssigkeit und wurde dann mittels Chloroforms wieder in eine klare Lösung übergeführt. Nach 48stündigem Stehen wurde das Reaktionsgemisch aufgearbeitet. Es wurde mit einem Gemisch von 100 ccm Äther und ebensoviel Kubikzentimeter $^n/_2$-Schwefelsäure aufgenommen, die abgehobene Ätherschicht noch 2mal mit je 60 ccm $^n/_2$-Schwefelsäure gründlich gewaschen und schließlich mit 20 ccm einer 10proz. Kaliumbicarbonatlösung geschüttelt. Beim langsamem Verdunsten der über Natriumsulfat getrockneten Ätherlösung schieden sich weiße Krystalle aus vom Schmelzpunkt 62,8°. Diese wurden wiederholt aus Äther umkrystallisiert und ein Endschmelzpunkt von 63,5° erreicht. Der aus der Mutterlauge gewonnene Körper unterschied sich hinsichtlich des Schmelzpunktes nur wenig von dem aus Lösung krystallisierten. Es war also anzunehmen, daß ein einheitlicher Körper vorlag. Ausbeute 3,9 g.

[1]) B. 28, 1167.

Analyse.

I. Bestimmung der Verseifungszahl.

Angewendete Substanz	Verbrauch an Kaliumhydroxyd	Verseifungszahl: Gefunden	Berechnet für ein Stearodipalmitin
0,7900 g	0,1599 g	202,4	201.6

II. Der Schmelzpunkt des Fettsäuregemisches lag bei 56,3°.

III. Bestimmung des Molekulargewichtes der Fettsäuren. Aus der Verseifungszahl berechnet sich das Molekulargewicht der Fettsäuren:

$$M = \frac{56100}{202,4} - 12,6 = 264,6 \text{ (berechnet 266,0).}$$

IV. Direkte Bestimmung des Molekulargewichtes der Fettsäuren:

Angewendete Substanz	Verbrauchte ccm $^n/_{10}$-KOH	Mol.-Gew. gef.
0,6369 g	24,09	264,3

V. Bestimmung der Stearinsäure (nach dem Verfahren von *Hehner* und *Mitchell*).

Angewendete Substanz	Gefundene Stearinsäure
1,3020 g	0,4538 g = 34,85%.

Der Schmelzpunkt der abgeschiedenen Stearinsäure lag bei 63,4°.

Die gefundenen Werte stimmen somit mit den berechneten Werten für ein Stearodipalmitin nahezu überein und es konnte daher keinem Zweifel unterliegen, daß ein einheitlicher Körper von der Zusammensetzung eines Stearodipalmitins vorlag; nach dem Wege der Synthese mußte dieses ein α-Stearo-αβ-dipalmitin sein.

Dieses synthetisch erhaltene Produkt stimmt demnach mit dem unlöslichsten Glycerid, das in Gänsefett aufgefunden wurde, überein.

Darstellung von β-Stearo-αα-dipalmitin.

$C_3H_5(C_{18}H_{35}O_2) \cdot (C_{16}H_{31}O_2)_2$.

Zur Gewinnung von β-Stearo-αα-dipalmitin wurde αα-Dipalmitin aus α-Jodhydrin über αβ-Dipalmitin-α-jodhydrin hergestellt.

αβ-Dipalmtin-α-jodhydrin.

$$\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2J \end{array} + 2\, C_{15}H_{31}COCl = \begin{array}{l} CH_2OOCC_{15}H_{31} \\ | \\ CHOOCC_{15}H_{31} \\ | \\ CH_2J \end{array} + 2\, HCl\,.$$

Die Darstellung dieses Körpers nach diesem Verfahren ist neu.

2 g Jodhydrin (= „*Alival*", das von den Höchster Farbwerken in liebenswürdigster Weise überlassen wurde) wurden in 3 ccm Chinolin gelöst und mit einer Lösung von 5,25 g Palmitinsäurechlorid und 6 ccm

Chloroform in der Kälte langsam versetzt. Die anfangs klare Lösung schied sich bald in 2 Schichten. Auf Zugabe von Chloroform trat wieder klare Mischung ein; dies wiederholte sich öfters. Im ganzen wurden nachträglich noch 7 ccm Chloroform hinzugegeben. Das rötlich gefärbte Reagensprodukt wurde 3 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Es wurde dann mit 200 ccm Äther aufgenommen, 2 mal mit je 20 ccm $^{n}/_{2}$-Schwefelsäure, dann Kaliumbicarbonatlösung und hierauf 3 mal mit 20 ccm Wasser gewaschen und die Ätherlösung über Natriumsulfat getrocknet. Nach Verdampfen des Äthers und Chloroforms blieb ein in der Kälte erstarrendes, gelbliches Öl zurück. Dieses wurde in 15 ccm Äther gelöst und mit so viel Methylalkohol versetzt, bis die eingetretene Trübung eben noch verschwand. Bei 0° schieden sich 6,1 g (= 90,2% der Theorie) krystallinisch aus. Aus viel Alkohol umkrystallisiert verblieb der Schmelzpunkt bei 46,2°.

αα-Dipalmitin.

$$\begin{array}{lcl} CH_2OOCC_{15}H_{31} & & CH_2OOCC_{15}H_{31} \\ | & & | \\ CHOOCC_{15}H_{31} & - & CHOH \\ | & & | \\ CH_2J & & CH_2OOCC_{15}H_{31} \end{array} .$$

3 g des oben gewonnenen $\alpha\beta$-Dipalmitin-α-jodhydrin wurden in einer Mischung von 30 ccm Methylalkohol und 3 ccm Wasser mit 3,5 g Silbernitrit etwa 30 Minuten am Rückflußkühler gekocht bis alles Jod abgespalten war. Die heiß filtrierte Flüssigkeit hinterließ beim Verdampfen des Alkohols auf dem Wasserbade ein dickes von Silberverbindungen verunreinigtes Öl. Dieses wurde mit 150 ccm absolutem Alkohol aufgenommen und einige Minuten mit Tierkohle gekocht. Aus dem Filtrat schied sich beim langsamen Verdunsten des Alkohols das Dipalmitin in Form weißer Flöckchen aus vom Schmelzpunkt 69,5°.

Bei weiterem Umkrystallisieren aus Alkohol blieb der Schmelzpunkt konstant. Die Ausbeute des reinen Präparates betrug 2,0 g = 80% der Theorie.

β-Stearo-αα-dipalmitin.

$$\begin{array}{lcl} CH_2OOCC_{15}H_{31} & & CH_2OOCC_{15}H_{31} \\ | & & | \\ CHOH & + C_{17}H_{35}COCl = & CHOOCC_{17}H_{35} + HCl \\ | & & | \\ CH_2OOCC_{15}H_{31} & & CH_2OOCC_{15}H_{31} \end{array} .$$

Von dem nach vorstehender Art gewonnenen $\alpha\alpha$-Dipalmitin wurde 1 g in 4 ccm Chloroform gelöst und mit 0,3 g Chinolin und 0,6 g Stearinsäurechlorid allmählich in der Kälte versetzt. Anfangs blieb die Mischung klar, nach einigen Stunden trübte sie sich und schied sich in 2 Schichten; letztere wurden durch Zugabe von wenig Chloroform in Lösung gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde 4 Tage stehengelassen und während dieser Zeit öfters umgeschüttelt. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei

der Darstellung von α-Stearo-αβ-dipalmitin. Die Ätherlösung schied bei 0° 1,3 g (ungefähr 88% der Theorie) eine weiße, krystallinische Masse ab, welche bei 39° klar schmolz; nochmals aus wenig Äther umkrystallisiert, zeigte sie Schmelzpunkt 59,1° und die Mutterlauge 58,5°.

Analyse.

I. Bestimmung der Verseifungszahl.

Angewendete Substanz	Verbrauch an Kaliumhydroxyd	Verseifungszahl: Gefunden	Verseifungszahl: Berechnet für ein Stearodipalmitin
0,5172 g	0,1045 g	202,0	201,6

II. Der Schmelzpunkt des Fettsäuregemisches betrug 56,3°.

III. Bestimmung des Molekulargewichtes der Fettsäuren. Aus der Verseifungszahl berechnet sich das Molekulargewicht der Fettsäuren:

$$M = \frac{56100}{202.0} - 12.6 = 265.1.$$

IV. Direkte Bestimmung des Molekulargewichtes der Fettsäuren. 0,4716 g verbrauchten 17,70 ccm $^{n}/_{10}$-KOH. Das Molekulargewicht betrug 266,4.

V. Bestimmung der Stearinsäure.

Angewendete Substanz	Gefundene Stearinsäure
0,2206 g	0,751 g = 34,04%.

Die abgeschiedene Stearinsäure schmolz bei 68,1°.

Wie oben ersichtlich stimmten die gefundenen Werte mit den berechneten nahezu überein, woraus erwiesen ist, daß die Synthese in einfacher Weise zu einem einheitlichen Körper von der Zusammensetzung eines Stearodipalmitins geführt hat. Nach der Synthese mußte dieser Körper die β-Verbindung (β-Stearo-αα-dipalmitin) darstellen und dürfte mit den bisher in den Fetten aufgefundenen Stearodipalmitin vom Schmelzpunkt 57—58,5° identisch sein.

Darstellung von α-Stearo-αβ-dipalmitin aus αβ-Dipalmitin-α-jodhydrin und Kaliumstearat.

$$\begin{array}{l} CH_2OOCC_{15}H_{31} \\ | \\ CHOOCC_{15}H_{31} \\ | \\ CH_2J \end{array} + KOOCC_{17}H_{35} = \begin{array}{l} CH_2OOCC_{15}H_{31} \\ | \\ CHOOCC_{15}H_{31} \\ | \\ CH_2OOCC_{17}H_{35} \end{array} + KJ\,.$$

1,2 g des oben hergestellten αβ-Dipalmitin-α-jodhydrin wurden mit 0,65 g frisch bereitetem Kaliumstearat innigst verrieben und in einem kleinen Kolben mit Steigrohr auf dem Ölbade bei 140—160° 6 Stunden lang erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde nach dem Erkalten 3 mal mit 60 ccm Äther ausgezogen. Die nach Verdampfen des Äthers zurückgebliebene gelbliche Masse wurde mit 100 ccm Alkohol gelöst, die

Lösung mit Tierkohle gekocht und filtriert. Beim langsamen Verdampfen des Alkohols krystallisierten 0,63 g eines bei 59° schmelzenden Körpers aus. Dieser zerfiel bei weiterem Umkrystallisieren wie folgt:

	1.	2.	3.	4.
Schmelzpunkt der Krystalle	59,6	59,8	60,2	60,8°
„ „ Glyceride der Mutterlauge	58,4	59,0	59,2	59,4°

Bei der 4. Krystallisation verblieben noch 0,26 g.

Das bei dieser Synthese erhaltene Endprodukt stellte also keinen reinen Körper dar; es zerfiel bei weiterer Krystallisation in Körper, welche hinsichtlich der Schmelzpunkte die Schlüsse ziehen lassen, daß sie als ein Gemisch beider isomeren Formen von Stearodipalmitin anzusehen sind.

Darstellung von α-Palmito-αβ-distearin.

$C_3H_5(C_{16}H_{31}O_2) \cdot (C_{18}H_{35}O_2)_2$.

Das für diese Synthese benötigte α-Monopalmitin wurde ebenfalls aus Acetonglycerin über Palmitylacetonglycerin gewonnen.

Aus 2,1 g Acetonglycerin wurden unter Einwirkung von 4 g Stearinsäurechlorid und 2,3 g Chinolin 4,8 g Palmitylacetonglycerin erhalten. Dasselbe zeigte die gleichen Eigenschaften wie das von *Emil Fischer*, *M. Bergmann* und *H. Bärwind*[1]) dargestellte; es schmolz bei 34,4°.

Die Spaltung des Acetonkörpers erfolgte analog dem Stearylacetonglycerin. Zur Umsetzung gelangten 4 g Palmitylacetonglycerin, welche 3,3 g α-Monopalmitin mit Schmelzpunkt 77,6° lieferten.

α-Palmito-αβ-distearin.

$$\begin{array}{l} CH_2OOCC_{15}H_{31} \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array} + 2\,C_{17}H_{35}COCl = \begin{array}{l} CH_2OOCC_{15}H_{31} \\ | \\ CHOOCC_{17}H_{35} \\ | \\ CH_2OOCC_{17}H_{35} \end{array} + 2\,HCl\,.$$

Von dem oben gewonnenen α-Monopalmitin wurden 1,5 g unter gelindem Erwärmen in 10 ccm trockenem Chloroform gelöst und mit 1,4 g Chinolin versetzt. Zu dieser Mischung wurden unter Abkühlen allmählich 2,7 g Stearinsäurechlorid hinzugefügt. Bei eintretender Trübung des Reaktionsgemisches wurde noch etwas Chloroform hinzugegeben. Nach 3tägigem Stehen wurde wie gewöhnlich aufgearbeitet. Der aus Äther auskrystallisierte Körper zeigte Schmelzpunkt 62,6°. Bei weiterem Umkrystallisieren aus Äther stieg der Schmelzpunkt auf 63,2° an, während die aus der Mutterlauge erhaltenen Krystalle bei 62,8° schmolzen. Die Ausbeute betrug 3,2 g (ca. 76% der Theorie).

---

[1]) B. **53**, 1603. 1920.

Analyse.

I. Bestimmung der Verseifungszahl.

Angewendete Substanz	Verbrauch an Kaliumhydroxyd	Verseifungszahl Gefunden	Verseifungszahl Berechnet für ein Palmitodistearin
1,102 g	0,2156 g	195,6	195,2

II. Bestimmung des mittleren Molekulargewichtes der Fettsäuren.

$$M = \frac{56100}{155,6} - 12,6 = 274,3 \text{ (berechnet 274,6).}$$

III. Der Schmelzpunkt der Fettsäuren lag bei 62,9°.

Der bei 63,2° schmelzende Körper ist also auf Grund obiger analytischer Ergebnisse einwandfrei als ein Palmitodistearin anzusprechen. Nach dem Gange der Synthese stellt er die α-Verbindung, das α-Palmito-αβ-distearin dar.

Darstellung von β-Palmito-αα-distearin.

$C_3H_5(C_{16}H_{31}O_2) \cdot (C_{18}H_{35}O_2)_2$.

αβ-Distearin α-jodhydrin.

$$\begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2J \end{matrix} + 2\,C_{17}H_{35}COCl = \begin{matrix} CH_2OOCC_{17}H_{35} \\ | \\ CHOOCC_{17}H_{35} \\ | \\ CH_2J \end{matrix} + 2\,HCl\,.$$

2 g α-Jodhydrin lieferten nach der Methode von *Emil Fischer* und *E. Pfähler* bei der Umsetzung mit 6,24 g Stearinsäurechlorid unter Zugabe von 3 ccm Chinolin 6,4 g gelblicher Krystalle, αβ-Stearin-α-jodhydrin. Nochmals aus Alkohol umkrystallisiert schmolz es bei 52,6° und stimmte auch in den andern Eigenschaften mit dem von genannten Forschern erhaltenen Präparat überein.

αα-Distearin.

$$\begin{matrix} CH_2OOCC_{17}H_{35} \\ | \\ CHOOCC_{17}H_{35} \\ | \\ CH_2J \end{matrix} - \begin{matrix} CH_2OOCC_{17}H_{35} \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OOCC_{17}H_{35} \end{matrix}\,.$$

Beim Kochen von 2 g des oben gewonnenen αβ-Distearin-α-jodhydrin mittels Silbernitrit in alkoholischer Lösung ergaben sich 1,3 g αα-Distearin. Dieses zeigte einen Schmelzpunkt von 79,5°, der auch durch Krystallisation nicht weiter verändert wurde.

β-Palmito-αα-distearin.

$$\begin{matrix} CH_2OOCC_{17}H_{35} \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OOCC_{17}H_{35} \end{matrix} + C_{16}H_{31}COCl = \begin{matrix} CH_2OOCC_{17}H_{35} \\ | \\ CHOOCC_{16}H_{31} \\ | \\ CH_2OOC_{17}H_{35} \end{matrix} + HCl\,.$$

Zur Darstellung von β-Palmito-$\alpha\alpha$-distearin wurde von 2 g des oben dargestellten $\alpha\alpha$-Distearin ausgegangen. Diese wurden in 6 ccm Chloroform gelöst und mit 0,5 g Chinolin versetzt. Unter Abkühlung wurde dann 0,96 g Palmitinsäurechlorid zugegeben. Bald trat Trübung ein und schließlich Trennung in 2 Schichten. Mittels Chloroform wurde wieder alles in Lösung gebracht. Das Reaktionsgemisch blieb 48 Stunden stehen und wurde dann mit einer Mischung von 100 ccm Äther und 60 ccm $^n/_2$-Schwefelsäure aufgenommen. Nach Ausschütteln mit Bicarbonat und Wasser wurde die ätherische Lösung der Krystallisation überlassen. Es wurden 2,4 g = 86% der Theorie eines bei 67,5° schmelzenden Körpers erhalten. Aus Äther umkrystallisiert stieg der Schmelzpunkt auf 67,9° an; die Mutterlauge schmolz bei 67,3°.

Analyse.

I. Bestimmung der Verseifungszahl.

Angewendete Substanz	Verbrauch an Kaliumhydroxyd	Verseifungszahl Gefunden	Verseifungszahl Berechnet für ein Palmitodistearin
0,9200 g	0,1797 g	195,3	295,2

II. Bestimmung des mittleren Molekulargewichtes der Fettsäuren. Aus der Verseifungszahl berechnet sich das mittlere Molekulargewicht der Fettsäuren zu

$$M = \frac{56100}{195,3} - 12,6 = 274,5\ .$$

III. Direkte Bestimmung des Molekulargewichtes der Fettsäuren. 0,6538 g Säuren verbrauchten zur Neutralisation 23,80 ccm $^n/_{10}$-KOH. Das Molekulargewicht beträgt demnach 274,7. Für ein Palmitostearin berechnet sich das Molekulargewicht der Fettsäuren zu 274,6.

IV. Der Schmelzpunkt der Fettsäuren lag bei 62,8°.

Somit ist der bei 67,9° schmelzende Körper ein Palmitodistearin, und zwar ein β-Palmito-$\alpha\alpha$-distearin.

Darstellung von α-Palmito-$\alpha\beta$-diolein.

$$\begin{array}{l} CH_2OOCC_{15}H_{31} \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array} + 2\,C_{17}H_{33}COCl = \begin{array}{l} CH_2OOCC_{15}H_{31} \\ | \\ CHOOCC_{17}H_{33} \\ | \\ CH_2OOCC_{17}H_{33} \end{array} + 2\,HCl\ .$$

2 g α-Monopalmitin (welches wie oben aus Acetonglycerin über **Palmitylacetonglycerin dargestellt** wurde) wurden in 10 ccm Chloroform **gelöst und mit 3,5 g Ölsäurechlorid** nach Zugabe von 1,8 g Chinolin **unter Abkühlen versetzt.** Nach 48stündigem Stehen bei einer Tem**peratur von 30—35° wurde wie üblich** aufgearbeitet. Nach Verdampfen **des Äthers hinterblieb ein gelbliches Öl.** Dasselbe wurde einige Male

in warmem Alkohol gelöst und der bei 0° sich abscheidende Niederschlag abfiltriert. Der so erhaltene Körper stellte ein gelbliches Öl dar, das nach kurzer Zeit, wahrscheinlich durch hydrolytische Spaltung, den für bestimmte Öle charakteristischen ranzigen Geruch und Geschmack zeigte.

Analyse.

I. Bestimmung der Verseifungszahl.

Angewendete Substanz	Verbrauch an Kaliumhydroxyd	Verseifungszahl Gefunden	Verseifungszahl Berechnet für ein Palmitodiolein
0,9394 g	0,1833 g	195,1	195,5

II. Bestimmung des Molekulargewichtes der Fettsäuren. Aus der Verseifungszahl berechnet sich das Molekulargewicht

$$M = \frac{56100}{195,1} - 12,6 = 274,9 \text{ (berechnet } 273,6) .$$

III. Bestimmung der Jodzahl.

Angewendete Substanz	Verbrauchte ccm $^n/_{10}$-Jodlösung	Jodzahl Gefunden	Jodzahl Berechnet für ein Palmitodiolein
0,2156 g	10,16	59,82	59,13

Nach den Analysenergebnissen ist also der erhaltene Körper als ein Palmitodiolein anzusprechen, dem auf Grund der Synthese die Struktur eines α-Palmito-αβ-dioleins zukommt.

Versuche zur Darstellung von β-Oleo-αα-distearin.

$C_3K_3(C_{18}H_{35}O_2) \cdot (C_{18}H_{33}C_2)_2$.

Um die β-Verbindung des Oleodistearins darzustellen, wurde von αα-Distearin ausgegangen. Von dem wie oben angeführt erhaltenen Präparat wurden 2 g in 6 ccm trockenem Chloroform gelöst, 0,5 g Chinolin und dann 1,1 g Ölsäurechlorid unter Abkühlen allmählich zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 Stunden bei einer Temperatur von 30—35° stehengelassen und hierauf wie gewöhnlich mit einer Mischung von gleichen Teilen Äther und eiskalter $^n/_2$-Schwefelsäure aufgenommen, mit Kaliumbicarbonatlösung und Wasser gewaschen. Bei langsamem Verdunsten des Äthers krystallisierten 1,9 g einer gelblichweißen Masse aus, welche zwischen 60—67° schmolz. Beim weiteren Umkrystallisieren aus Alkohol stieg der Schmelzpunkt auf 79° an, während die Mutterlauge eine dickflüssige, ölige Masse lieferte, welche stark sauer reagierte. Dadurch wiederholte Krystallisation kein reiner Körper erhalten wurde (die bei der letzten Krystallisation gewonnenen Krystalle schmolzen bei 77° und wogen 0,8 g, die entsprechende Mutterlauge bei 64°), mußte angenommen werden, daß überhaupt keine Reaktion eingetreten war. Die Synthese wurde deshalb wiederholt.

Diesmal wurden zur Umsetzung 1 g $\alpha\alpha$-Distearin und 0,6 g Ölsäurechlorid angewandt. Statt Chinolin wurde trockenes Pyridin zugegeben, und zwar 0,9 g. Nach 3stündigem Stehen bei 35° und 48stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde wie oben aufgearbeitet. Auch diesmal wurde ein Körper (0,8 g) gewonnen, der sehr unscharf schmolz (62—65°) und wie das oben erhaltene Präparat bei weiterer Umkrystallisation in einen bei 76° schmelzenden Körper und in eine ölige Masse zerfiel. Es konnte also auch bei dieser Synthese angenommen werden, daß das angewandte Ölsäurechlorid an der Reaktion nicht teilnahm.

Versuche zur Darstellung von α-Oleo-$\alpha\beta$-distearin.

$C_3H_5(C_{18}H_{33}) \cdot (C_{33}H_{33}O_2)_2$.

Zur Darstellung der α-Verbindung des Oleodistearins gingen wir ebenfalls von Acetonglycerin aus, das nach vorstehend beschriebenem Verfahren gewonnen wurde. Auf 4,2 g Acetonglycerin ließen wir 10 g Ölsäurechlorid einwirken bei einer Temperatur von 15—20°. Die Reaktion ging ziemlich glatt vonstatten und wir erhielten ein gelblich gefärbtes Öl (11,5 g). Aus dem so erhaltenen Oleinacetonglycerin wurde durch Behandeln mit Salzsäure das Aceton abgespalten und ein dickflüssiges, schwach gelb gefärbtes Öl von der Jodzahl 67,22 erhalten.

α-Oleo-$\alpha\beta$-distearin.

3,6 g des oben erhaltenen α-Monoolein wurden in 4 ccm Chloroform gelöst und mit einer Mischung von 6,4 g Stearinsäurechlorid, 3 g Chinolin und 10 ccm Chloroform allmählich versetzt. Bald trübte sich das Reaktionsgemisch und es entstand schließlich eine breiige Masse. Das Reaktionsprodukt wurde mit einer Mischung von 100 ccm Äther und 50 ccm $^n/_2$-Schwefelsäure (0°) aufgenommen. Schon beim Lösungsversuch in Äther zeigte sich, daß nur ein kleiner Teil des Reaktionsproduktes in Lösung ging, während der größte Teil sich in Form weißer, flöckchenartiger Gebilde auf der Zwischenschicht zwischen Äther und Schwefelsäure abschied. Der aus Äther gewonnene Körper bildete noch schwach gelblich gefärbte Krystalle vom Schmelzpunkt 42,0°. Die Jodzahl dieses Körpers betrug 31,4. Der in der Hauptmenge sich ausscheidende krystalline Körper wurde als Stearinsäureanhydrid erkannt. Es ist also in vorliegendem Falle nur zum geringen Teil der gesuchte Körper erhalten worden, während durch anderweitige Umsetzungen ein unerwünschtes Nebenprodukt entstand.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Die Synthesen der Glyceride aus Diacylhalogenhydrin unter Einwirkung von Fettsäuren bzw. fettsauren Salzen bei höherer Temperatur berechtigt nicht zu Schlußfolgerungen hinsichtlich der Stellung der

Säuregruppen im Glyceridmolekül. Die bisherige Annahme, daß die im Molekül schon vorhandenen Acyle ihre Stellung bei Einführung neuer Säuregruppen unverändert beibehalten, ist, wie obige Beispiele zeigen, nicht immer richtig.

2. Das im Gänsefett vorhandene Stearodipalmitin mit Schmelzpunkt 63° ist ein α-Stearo-αβ-dipalmitin.

3. Die bei 57,7° schmelzende Verbindung stellte deren Isomeres, das β-Stearo-αα-dipalmitin, dar.

4. Das in den Fetten nachgewiesene Palmitodistearin vom Schmelzpunkt 68° ist nicht, wie bisher angenommen wurde, ein α-Palmito-αβ-distearin, sondern dessen Isomeres, und zwar ein β-Palmito-αα-distearin.

5. Das bei 63° schmelzende Palmitodistearin ist nicht, wie bisher irrtümlich angenommen wurde, ein β-Palmito-αβ-distearin, sondern diesem isomer, demnach ein α-Palmito-αβ-distearin.

6. Die Synthese des Palmitodioleins über Acetonglycerin führt zu den gewünschten Ergebnissen, während

7. bei der Darstellung des α-Oleodistearins aus α-Monoolein und Stearinsäurechlorid wohl Oleodistearin erhalten wird; dabei entstehen aber in überwiegender Menge Reaktionsnebenprodukte.

8. Die Synthese des β-Oleo-αα-distearins über α-Jodhydrin nach dem von *Emil Fischer* und *M. Bergmann* gezeigten Weg ergab keine befriedigenden Resultate.

9. Die Glyceride, welche nach dem Verfahren von *Emil Fischer* und *M. Bergmann* dargestellt werden konnten, wurden durchwegs in guten Ausbeuten gewonnen, während

10. die früheren Synthesen aus Halogenhydrin und fettsauren Salzen zu keinen guten Ausbeuten und nicht einheitlichen Körpern führten. Es konnte vielmehr bewiesen werden, daß gleichzeitig Nebenprodukte und isomere Glyceride entstehen.

Notiz über die Sekretionswirkung des Nicotinsäure-methylester-chlormethylats.

Von

Katsumi Haramaki (Sagaken).

(Aus der Experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 17. März 1922.)

Loewy und *Wolffenstein*[1]) haben gefunden, daß durch Anlagerung einer N-Methylgruppe an den Nicotinsäureester ein Körper entsteht, der pharmakologisch die speicheltreibende und drastisch-abführende Wirkung des Arecolins hat bei gegenüber dem Arecolin stark herabgesetzter Giftigkeit. Beim tertiären Nicotinsäuremethylester ist die arecolinartige Wirkung keineswegs schon vorhanden; sie tritt erst auf bei dem Übergang in das quaternäre Chlormethylat (Cesol).

```
     /CH\               /CH\\                 /CH2\
H2C      C—COOCH3    HC      C—COOCH3    H2C       CH—COOCH3
 |       |            ||     |            |        |
H2C      CH2         HC      CH          H2C       CH2
   \  N  /              \ N //              \  N /
      |                  / \                 /  \
     CH3              H3C   Cl           Cl  CH3 CH3
   Arecolin              Cesol               Neu-Cesol
```

Fernerhin stellten diese Autoren aus dem Cesol durch Hydrierung eine weitere Verbindung dar, die die genannte pharmakologische Wirkung bei geringerer Dosierung verstärkt zeigte. Herr Professor *Loewy* bat, diese Verbindung einmal hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Magensaftsekretion zu prüfen. Das Resultat war, daß das Neu-Cesol genau wie das Arecolin [*Gottlieb* und *Meyer*[2])] eine sehr stark safttreibende Wirkung auf den Magen ausübt.

Versuchsbeispiele.

Hund I mit *Pawlow*schem Magenblindsack.

Subcutane Injektion von 0,05 g Neu-Cesol in 10 ccm Wasser bei nüchternem Tiere. Magensaftmenge innerhalb von 1 Stunde 30 Minuten 17,8 ccm.

Hund II mit *Pawlow*schem Magenblindsack.

Subcutane Injektion von 0,1 g Neu-Cesol in 10 ccm Wasser bei nüchternem Tiere. Magensaftmenge innerhalb von 1 Stunde 30 Minuten 19,0 ccm.

In allen Fällen war auch eine starke Speichelabsonderung zu bemerken.

---

[1]) *Loewy, A.* und *Wolffenstein, R.*, Therapie der Gegenwart 1920.

[2]) *Gottlieb* und *Meyer*, Lehrbuch der experimentellen Pharmakologie.

Zur Diagnostik der Proteine und deren Abkömmlinge mittels der Farbenreaktionen.

Von

M. A. Rakusin.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium des staatlichen wissenschaftlich-technischen Instituts zu Petersburg.)

(Eingegangen am 8. Februar 1922.)

I. Einleitung.

Es ist bekannt, daß manchen Farbenreaktionen, wie der Biuretreaktion, der von *Millon*, der Xanthoproteinreaktion usw. in der Biochemie grundlegende Bedeutung zukommt, und allerdings viel größere als es bei den Farbenreaktionen überhaupt der Fall ist: man erinnere sich nur der zahlreichen Reaktionen mit Eisenchlorid, aus denen chemisch-analytische Schlüsse nur mit gewisser Vorsicht zu ziehen sind, die aber andererseits auch nicht zu unterschätzen sind. Beachtet man nun, daß jeder Farbenreaktion der Proteine gewisse Atomgruppen entsprechen, so kommt man zur Überzeugung, daß eine klare Vorstellung über die chemische Natur eines Proteins man nur durch die Kenntnis eines *Komplexes von Farbenreaktionen* gewinnen kann, nicht aber durch Prüfung der zu untersuchenden tierischen oder pflanzlichen Substanz auf die eine oder die andere Farbenreaktion.

Wir haben uns deshalb entschlossen, die wichtigsten Proteine der Tier- und Pflanzenwelt sowie deren Abkömmlinge, d. h. die Fermente und Toxine einer *vergleichenden* Untersuchung in bezug auf ihr Verhalten gegen Farbenreaktionen zu unterziehen, und haben wir in das Bereich unserer Arbeit folgende Farbenreaktionen aufgenommen: die Biuretreaktion, die von *Millon*, die Xanthoproteinreaktion, die von *Liebermann*, *Adamkewitsch*, *Molisch* und *Pettenkofer*. Alles sowohl über die Technik als den Chemismus dieser in allen Lehr- und Handbüchern der Biochemie eingehend beschriebenen Reaktionen sei als bekannt vorausgesetzt. — Im Anschluß hieran wurde von uns auch die vor einigen Jahren von *Ostromyslenski*[1]) in Vorschlag gebrachte Reaktion mit Pikraminsäure studiert, und soll diese wichtige, aber in der Literatur noch wenig bekannte Reaktion unten beschrieben werden.

Die sog. „Schwefelbleireaktion" von *Vohl*[2]) haben wir auch in unsere Betrachtungen aufgenommen, obgleich sie keine eigentliche Farben-

[1]) *I. I. Ostromyslenski*, Journ. d. russ. physiko-chem. Ges. **1915**, **S. 317**.

[2]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **9**, 876. (Zit. nach *Lassar-Cohn*, **Arbeitsmeth.**).

reaktion ist, und zwar geschah dies nicht nur deshalb, daß diese Reaktion gewöhnlich unter den Farbenreaktionen beschrieben wird, sondern weil unsere Kenntnisse über das Verhalten der Proteine gegen die Reaktion von *Vohl* recht lückenhaft sind; es schien deshalb am Platze, hier auch die von *Rakusin*[1]) zum Nachweis der *Chondroitinschwefelsäure* vorgeschlagene Reaktion mittels $BaCl_2$ (s. u.) zu besprechen, zumal da bereits *Vohl* feststellte, daß seine Reaktion ausbleibt, falls der Schwefel in der Substanz an Sauerstoff gebunden ist.

Wir werden mit Rücksicht auf das Gesagte zunächst das Verhalten der nativen Proteine und deren Verwandten gegen die erwähnten 8 eigentlichen Farbenreaktionen besprechen, und dann gegen die 2 Schwefelreaktionen von *Vohl* sowie *Rakusin*, die, wie man sieht, einander ergänzen. Unsere Hauptaufmerksamkeit soll den eigentlichen Farbenreaktionen zugewandt sein, und zwar in ihrer Anwendung auf reine Proteinsubstanzen, als in Gegenwart einiger wichtiger chemischer Reagentien, die fällend, koagulierend usw. wirken. — Bevor wir aber auf unser Thema eingehen, müssen wir einige Worte der erwähnten Reaktion von *Ostromyslenski* widmen, da diese Reaktion, wie gesagt, erst während des Krieges ausgearbeitet wurde.

II. Die Reaktion von Ostromyslenski.

1915 machte *Ostromyslenski*, dem wir wichtige Beiträge zur Kenntnis der chemischen Natur der Toxine und Antitoxine, als Abkömmlingen der amphoteren Proteine, verdanken[2]), die Beobachtung, daß Pikraminsäure (also ein amphoterer Körper) in Pulverform angewandt, mit Eialbumin, Pseudo- und Euglobulin des Pferdeserums, reinem Pepton sowie Albumose sofort eine *intensive dunkelrote Färbung* gibt, gleichviel ob die Substanz in Lösung oder in Form einer Emulsion zur Anwendung kam. Der Empfindlichkeitsgrad der Reaktion wird unten angegeben werden. Beim Schütteln tritt die Reaktion momentan ein. In schwachen Lösungen oder falls die Substanz an und für sich gefärbt ist, stellt man sich in einem Probierglase eine gesättigte Lösung von Pikraminsäure dar (also mit einigen Körnchen am Boden des Glases), mit der die Färbung der Reaktion verglichen wird. Es versteht sich von selbst, daß die Lösung keine alkalisch reagierenden Substanzen wie NH_3, Soda, NaOH usw. enthalten darf, sowie keine Salze, deren Säuren durch Pikraminsäure verdrängt werden. So z. B. reagieren Ammoniumoxalat, Salmiak und Ammoniumnitrat erst beim Erwärmen, während reines Carbamid überhaupt nicht reagiert (s. u.). Die Empfindlichkeit der

[1]) Journ. d. russ. physiko-chem. Ges. 1917, S. 200—207.

[2]) *I. I. Ostromyslenski*, „Die partielle Synthese der Antitoxine". Journ. d. russ. physiko-chem. Ges. 1915; derselbe, „Der Schlaf beim Menschen und den Tieren". Monographie. Moskau, 1918.

Pikraminsäure gegen schwache Basen, resp. amphotere Körper ist so groß, daß die Färbung selbst mit Borax resp. $Al(OH)_3$ eintritt.

Den *Chemismus* dieser Reaktion klärte *Rakusin*[1]) auf, und zwar nachdem er zufälligerweise bei der Darstellung des Ovokeratins, nach *Ladenburgs* Handw. d. Chemie, beobachtete, daß der Essigsäureauszug aus den Schalenhäutchen des Hühnereies *nur die Reaktion* von *Ostromyslenski* gibt. Da aber Essigsäure den Schalenhäutchen nur eine *Aminosäure* entziehen kann, so wurde der Sinn der Reaktion mit Pikraminsäure klar. Versuche mit Glykokoll und Asparaginsäure bestätigten die Richtigkeit der Annahme. Die Notwendigkeit einer *freien* NH_2-Gruppe ergab sich daraus, daß die Reaktion mit Pikraminsäure mit salzsaurem Glykokoll usw. ausblieb. So wird es begreiflich, warum die Pikraminsäure mit den Proteinsubstanzen so leicht in Verbindung tritt. Sie tritt aber auch mit den Imidogruppen in Verbindung, z. B. mit Diphenylamin, und schließlich auch mit Körpern, die dreiwertigen Stickstoff enthalten, wie das beispielsweise bei den *Alkaloiden* (mit Ausnahme des Strychnins) der Fall ist. — Daß die Pikraminsäure tatsächlich nur mit den stickstoffhaltigen Gruppen der Proteine in Verbindung tritt, folgt noch aus dem Umstande, daß die *Proteinate* der Alkalimetalle mit ihr *ebenso wie die Proteine reagieren*. Eine *merkwürdige Ausnahme* bilden nur die *Proteinate des Ammoniums*. Offenbar finden in der komplizierten Molekel der entstandenen Verbindung soviel N-Atome, wegen der „sterischen Hinderung“ im Sinne von *Bischoff*, keinen Platz mehr. Allerdings ist das ein interessantes chemisch-analytisches Merkmal, welches auch für die Praxis von Bedeutung ist: so unterschieden wir z. B. Nutrose (Na-Caseinat) vom Eucasen (NH_4-Caseinat).

Zuletzt sei auf die schwer erklärliche Tatsache hingewiesen, daß die Pikraminsäure mit Harnstoff nicht reagiert (s. o.), wohl aber mit Oxamid; des weiteren sei bemerkt, daß auch Saccharin (*Fahlberg*) eine negative Reaktion mit Pikraminsäure gibt, was höchstwahrscheinlich auf die acidifizierende Wirkung der SO_2- und CO-Gruppe zurückzuführen wäre.

Wir gestatteten uns deshalb, solange bei der Reaktion mit Pikraminsäure zu verweilen, weil, wie man sieht, wir in der Pikraminsäure nicht nur ein gefärbtes Reagens auf *amphotere* Körper haben, analog dem farblosen $Al(OH)_3$, sondern weil dieses Reagens uns auch einen Einblick in die Struktur der Proteine gibt. Deshalb wiesen wir auch auf das Verhalten der Pikraminsäure gegen die *amphoteren Alkaloide* hin, die deshalb eben ein ganz eigentümliches Verhalten gegenüber den Proteinen aufweisen, und worauf wir a. a. O. zurückzukommen gedenken.

Wir sehen somit, welch eine wichtige biochemische Bedeutung der Reaktion von *Ostromyslenski* zukommt. Glücklicherweise spalten sich,

[1]) Journ. d. russ. physiko-chem. Ges. 1917. S. 164—169.

wie wir später sehen werden, bei einer ganzen Reihe von Prozessen von den Proteinen Körper ab, die nur mit Pikraminsäure reagieren: es kann also keinem Zweifel unterliegen, daß man in nächster Zukunft die chemische Natur dieser Körper, zu denen wahrscheinlich auch die Vitamine gehören, wird kennenlernen.

III. Einige Betrachtungen über die eigentlichen Proteinreaktionen überhaupt und über deren Klassifikaten.

Von den erwähnten 8 eigentlichen Farbenreaktionen sind die von *Molisch* und *Pettenkofer* Reaktionen lediglich auf *Kohlenhydrate*, die sämtlichen Proteinen entweder in größerer oder geringerer Menge beigemengt sind oder in Form von Glucosiden gebunden sind. Die übrigen 6 Reaktionen sind die „eigentlichen Proteinreaktionen" oder *Stickstoffreaktionen*, wie wir sie zweckmäßig nennen wollen. Es ist leicht, sich zu überzeugen, daß die Kohlenhydratkomplexe bei allen Reaktionen der Proteine, die sich auf die *Polypeptide* beziehen, unangegriffen bleiben: so hat z. B. *Heidenhain* [1]) mit vollem Recht die „Färbung" der Proteine mit Anilinfarbstoffen als *Fällungsreaktion* betrachtet; wir haben uns wirklich überzeugt, daß an diesen Färbeprozessen die Kohlenhydrate nicht teilnehmen; sie bleiben vielmehr ungefärbt im Filtrat und lassen sich durch die Reaktionen von *Molisch* und *Pettenkofer* nachweisen. Verdampft man solch ein Filtrat auf einem Uhrglase, so hinterbleiben diese *Kohlenhydrate* meist als *Mikrokrystalle.* Wir kommen also zum wichtigen Schluß, daß den kolloiden, amphoteren Proteinsubstanzen krystallinische, indifferente Kohlenhydrate beigemengt sind, die nach dem Vorschlage *Abderhaldens* [2]) durch passende *Lösungsmittel* zu entziehen sind, um zu chemisch reinen, individuellen Proteinen zu kommen, was durch die Methode des „Aussalzens" sich nicht erzielen läßt. Das von der Färbung mit Anilinfarbstoffen Gesagte gilt auch von den anderen Fällungsreaktionen, also auch von der Fällung mit Tannin („Gerbung"), Sublimat, Bleizucker usw. Bei all diesen Prozessen bleiben die den Proteinen beigemengten Kohlenhydrate unangegriffen im Filtrat, was natürlich vom höchsten theoretischen und praktischen Interesse ist.

Was die einzelnen der 8 Farbenreaktionen anbetrifft, so sei hierüber im Anschluß an das aus den Hand- und Lehrbüchern geläufige folgendes bemerkt. Über die *Biuretreaktion* liegen wertvolle Mitteilungen von *Tschugajew* [3]) vor. Des weiteren machte ich die merkwürdige Beobachtung, daß die Biuretreaktion durch die *Gegenwart von* NH_3, welches bei der Hydrolyse der von *Abderhalden* und seinen

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 1892, S. 115.
[2]) *Abderhalden*, Lehrb. d. physiol. Chem. **I**.
[3]) Journ. d. russ.- physiko.-chem. Ges. 1909, S. 166—184.

Schülern[1]) sowie *Osborne* und seinen Schülern[2]) untersuchten Pflanzenproteine auftritt, *nicht maskiert* wird. Dagegen läßt sich die Biuretreaktion in Gegenwart von Milchzucker nicht ausführen, weil rotes Kupferoxydul ausfällt. Diese Erscheinung tritt bei der Prüfung der Milch entgegen, welche sonst alle Reaktionen des Caseins (s. u.) gibt.

Die *Reaktion* von *Millon*, die als Reaktion auf die Oxyphenylgruppe betrachtet wird, geben bekanntlich nur solche Proteinstoffe, die in ihrem Molekel Tyrosin enthalten. Deshalb richtet man sich auch bei der Isolierung des Tyrosins aus den Produkten der Hydrolyse mittels 25 proz. Schwefelsäure nach der Methode von *E. Fischer* und *E. Abderhalden*[3]) nach der Reaktion von *Millon*. Es sei aber bemerkt, daß nach *Abderhalden* und *Kempe*[4]) auch Tryptophan mit dem *Millon*schen Reagens eine braunrote Färbung gibt, und daß es eine ganze Reihe von sog. „Millonkörpern" gibt, wie z. B. Phenolphthalein, Resorcin, m-Kresol usw., über die man in der Realencyklopädie der gesamten Pharmazie[5]) das Nähere finden kann. Hierselbst wird auch auf den wahrscheinlichen Chemismus der *Millon*schen Reaktion näher eingegangen.

Die *Xanthoproteinreaktion* beruht auf der Nitrierung aromatischer Kerne, so daß das Ausbleiben derselben auf die Abwesenheit von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, dieser für die Nahrungsprozesse so wichtigen, ja unentbehrlichen Produkte hinweist (s. u.).

Die *Reaktionen* von *Liebermann* und *Adamkewitsch* werden bekanntlich beide als Reaktionen auf Tryptophan bezeichnet[6]). Indessen lehrte uns die Erfahrung, daß jede der 2 genannten Reaktionen höchstwahrscheinlich einem ganz bestimmten Körper oder richtiger Atomgruppierung entspricht, denn es gibt, wie wir bald sehen werden, Proteinstoffe, die *nur eine der 2 genannten Reaktionen geben*. So z. B. gibt Casein nur die Reaktion von *Adamkewitsch* und gilt das gleiche sowohl vom Legumin aus Hülsenfrüchten als von dem aus süßen Mandeln. Auch Ovokeratin (*Huhn*) zeugt ein ähnliches Verhalten gegen die Tryptophanreaktionen. — Extrahiert man Pepsin-Fibrinpepton mit 95 proz. Alkohol, so hinterbleibt im Rückstand ein polypeptidartiger Körper, der nur die Reaktion von *Liebermann* (und selbstverständlich die Xanthoproteinreaktion) gibt. Es wird also die Möglichkeit geboten, zu untersuchen, welchen Gebilden die Reaktion von *Liebermann* resp. von *Adamkewitsch* entspricht. Eben diese Frage soll Gegenstand einer unserer nächsten Arbeiten sein.

---

[1]) *Abderhalden*, l. c.; hierselbst Literatur.

[2]) Ebenda.

[3]) *E. Fischer* und *E. Abderhalden*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1904, S. 540.

[4]) *E. Abderhalden* und *M. Kempe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1907, S. 207.

[5]) Realenz. d. ges. Pharmaz. **9**, 48. 1907.

[6]) *C. Oppenheimer*, Handb. d. Bioch. d. Tiere u. d. Menschen **1**, 269. 1909; hierselbst Literatur.

IV. Verhalten der wichtigsten Proteine und deren Derivate gegen Farbenreaktionen.

Wir haben bereits gesehen, welchen Einblick bloß die Reaktion von *Ostromyslenski* in die Struktur der Proteinstoffe bietet. Auch wissen wir, daß das Auftreten der Biuretreaktion die Haupteigenschaft eines echten Proteins ist. Deutet nun jede Reaktion auf das Vorhandensein einer gewissen Atomgruppierung hin, so ist es klar, daß ein Proteinstoff sich um so mehr den *vollwertigen* Nahrungstoffen nähert, je vollständiger der Komplex der von ihm aufgewiesenen Reaktionen ist. In der Tat ersieht man aus der beiliegenden *Tabelle* (auf S. 274), daß nur *Huhnalbumin*, also einer der vollwertigsten Eiweißstoffe, *alle 8 Farbenreaktionen aufweist*, während z. B. *Gelatine*, der bekanntlich Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan fehlen, und die deshalb, wie *Abderhalden*[1]) darauf hinweist, keinen selbständigen Nährwert haben kann, von den 6 besprochenen Stickstoffreaktionen der Proteine nur die Biuretreaktion aufweist, und somit ein Bruchstück (Abbauprodukt) des Protoplasmaeiweißes repräsentiert. Speziell von der Gelatine sei ferner bemerkt, daß dieselbe etwa durch Extraktion mit Alkohol (s. o.) der beigemengten Kohlenhydrate beraubt werden kann, und man so auf einen recht einfach zusammengesetzten Proteinstoff kommt, der von den 8 Farbenreaktionen *nur die Biuretreaktion* aufweist. Auf ähnliche, überaus wichtige und interessante Fälle werden wir noch mehrmals kommen. Ja vielleicht gelingt es durch Behandlung der Proteinstoffe nach dem Vorschlage *Abderhaldens* (s. o.) *mit den üblichen Lösungsmitteln* (Alkohol, Äther usw.) diese Stoffe *exakt zu fraktionieren*. Über einige wertvolle Daten in dieser Beziehung verfügen wir schon; doch würde die Anführung derselben uns hier zu weit führen.

Setzen wir nun unsere *vergleichenden* Betrachtungen fort, so sehen wir z. B., daß das Chondrin sich vom Glutin nur durch eine positive Xanthoproteinreaktion unterscheidet, daß es also gerade die dem Glutin (Gelatine) fehlenden aromatischen Gebilde enthalten muß.

Die beiliegende Tabelle, in der ich mit meinen Mitarbeitern vor einigen Jahren Angaben über einige typische Proteine und Fermente zusammenfaßte, und zwar mit Angabe der *Empfindlichkeitsgrenzen* der einzelnen Reaktionen[2]), enthält jetzt eine Übersicht der Eigenschaften einer viel größeren Anzahl von Objekten, und haben diese Daten unzweifelhaft chemisch-analytische Bedeutung, da Präparate verschiedener Herkunft stets dieselben Reaktionen aufweisen, welch letztere mit den hydrolytischen Daten von *Emil Fischer*, *Emil Abderhalden*, *Osborne* und ihren Mitarbeitern, oft gut übereinstimmen, so daß diese Daten einander ergänzen.

[1]) *E. Abderhalden*, Lehrb. d. physiol. Chem.

[2]) Journ. d. russ. physiko-chem. Ges. 1915. S. 2051—2056.

Tabelle I.

Tabelle der Farbenreaktionen der wichtigsten Proteine u. deren Derivate.

Substanzen	Stickstoffreaktionen: *Biuret*	*Millon*	*Xanthopret*	*Liebermann*	*Adamkewitsch*	*Ostromysl.*	Kohlenhydrat-Reaktionen: *Molisch*	*Pettenkofer*	Bemerkungen
A. Anim. Proteine:									
1. Eialbumin	1 : 110	1 : 13560	1 : 6780	1 : 840	1 : 1690	1 : 370	1 : 920	1 : 890	
2. Blutfibrin	+	+	+	–	+	Unausf.	+	+	(S. u.)
3. Pepsin-Fibrinpepton	1 : 800	1 : 800	1 : 800	1 : 1600	1 : 6400	1 : 2380	1 : 1190	1 : 1190	
4. Glutin, Gelatine, α-Leim	1 : 3200	–	–	–	–	1 : 1030	1 : 1030	–	(S. u.)
5. Hautpulver	+	–	–	–	–	+	+	+	(S. u.)
6. β-Leim	1 : 1640	–	–	–	–	1 : 850	1 : 4000	–	
7. Chondrin, Knorpelleim	1 : 4060	–	1 : 1010	–	–	1 : 200	1 : 1720	–	(S. u.)
8. Elastin	1 : 1000	–	–	–	–	–	1 : 7240	–	(S. u.)
9. Ovokeratin, aus Schalenhäutchen des Hühnereis	1 : 1110	1 : 1110	1 : 8200	–	1 : 7700	1 : 1230	1 : 800	1 : 1110	
10. Casein n. Hammarsten	1 : 1820	1 : 660	1 : 2640	–	1 : 2640	1 : 1110	1 : 600	1 : 2400	
11. Nucleinsäure	–	–	–	–	–	–	1 : 730	–	
12. Nuclein n. Hobratschewsky	–	–	–	–	–	1 : 730	+	–	
13. Proteinate des Li, Na und K reagieren, wie die entsprechenden Proteine.									
14. „ „ Ammoniums geben alle Farbenreaktionen der entsprechenden Proteine mit Ausnahme der von Ostromyslenski.									
B. Pflanzenproteine:									
15. Glutein, Kleber	1 : 1660	–	1 : 6600	–	1 : 6600	–	1 : 1400	1 : 1120	
16. Legumin	1 : 3000	1 : 1500	1 : 1500	–	1 : 14900	1 : 1500	1 : 14900	1 : 3000	
17. Legumin aus süßen Mandeln gibt dieselben Reaktionen, wie gewöhnliches Legumin und Casein.									
18. Leguminate des Li, Na und K reagieren, wie die entsprechenden Proteinate des Tierreichs.									
19. „ „ Ammoniums „ „ „ „ „ „ „									
C. Fermente:									
20. Pepsin, rossicum	–	–	–	–	–	Spur.	1 : 1850	–	
21. Papain	–	–	–	–	Spur.	–	+	–	(S. u.)
22. Trypsin	1 : 980	–	1 : 465	–	–	–	1 : 6250	–	(S. u.)
23. Diastase	1 : 1700	–	1 : 840	–	–	1 : 750	1 : 6660	–	
24. Pankreatin	1 : 100	–	–	–	–	1 : 400	1 : 13300	–	
25. Hefe, gepulvert	–	Spur.	–	–	+	+	+	+	(S. u.)
D. Toxine:									
25. Alt-Tuberkulin, Koch's — Gibt dieselben Reaktionen, wie Casein; enthält Phosphor.									(S. u.)
26. Tuberkulin DENYS. (Moskau.)	–	–	Spur	Spur.	1 : 6000	1 : 300	1 : 300	1 : 300	NH_3
27. Tuberkulin DENYS. (Louvain.)	–	1 : 890	1 : 3570	1 : 220	1 : 7100	1 : 7100	1 : 3550	1 : 3550	NH_3
28. Spermin, Poehl (Leucomain n. A. Gauthier)	+	–	+	–	+	+	+	+	
E. Antitoxine:									
29. Diphtherieheilserum, Diphtherieantitoxin	1 : 660	1 : 330	1 : 660	1 : 2500	1 : 9000	1 : 1250	1 : 330	1 : 1250	

Die Daten dieser Tabelle, die eventuell auch als *Wandtafel* im Laboratorium (so tun wir auch) gebraucht werden kann, prägen sich leicht und gut im Gedächtnis ein.

Die aus der Tabelle zu ziehenden Schlüsse sind überaus lehrreich. Vor allem sieht man, daß den *Nucleoalbuminen* des Tier- und Pflanzenreichs, im Vergleich zum Eialbumin, Fibrin und dessen Pepton, eine Substanz fehlt, die die Reaktion von *Liebermann* gibt, die aber für die Ernährung des Säuglings nicht unentbehrlich ist, da das Casein der Milch doch hierzu ausreicht. Des weiteren wird es klar, warum in den bekannten Versuchen von *I. P. Pawlow* der scheinbaren Fütterung

des Hundes das Fibrinpepton, dessen der Meister sich eben bediente, solche gute Resultate ergab. Unter den Nucleoalbuminen haben wir deshalb auch auf das *Legumin aus süßen Mandeln* (selbst bereitet) hingewiesen, weil die Tatsache, daß auch in der Mandel, wie in anderen ölhaltigen Samen, beträchtliche Leguminmengen enthalten sind, der Vergessenheit anheimfiel. Indessen wies bereits *Liebig*[1]) auf die Analogie zwischen den Caseinen der Kuh- und Mandelmilch hin („Pflanzenkäse"), und so sehen wir auch, daß beide Körper ein analoges Verhalten gegen die Farbenreaktionen aufweisen, ferner gegen Ammoniak und Alkalien (Leguminate) usw.

Ein Vergleich der Daten der durchgreifenden und noch besser der gelinden Hydrolyse mit den Ergebnissen der Untersuchung nach vorgeführtem Schema wird in jedem einzelnen Falle die Frage beantworten, in welcher Richtung die Erforschung der Zusammensetzung des betreffenden Proteins fortzusetzen wäre. Hier sei aber noch auf die analogen Reaktionen der *Gelatine* und der *tierischen Haut* einerseits und zwischen *Keratin* (des Hühnereis) und *Casein* andererseits hingewiesen. Steht die erstere Analogie im großen ganzen im besten Einklange mit den diesbezüglichen trefflichen Untersuchungen der um die Chemie der tierischen Haut hochverdienten Forscher, *von Schroeder* und *Paessler*, so muß man sagen, daß das Ovokeratin auch wesentliche Unterschiede vom Casein aufweist: vor allem ist er sehr schwer löslich in Ammoniak und Alkalien; auch zeichnet sich Keratin durch seinen hohen Schwefelgehalt (7,62% Cystin) nach *Lindwall*[2]), sowie fast völlige Abwesenheit von Phosphor aus. Was nun die übrigen Daten der Hydrolyse der Keratine anbetrifft, so divergieren dieselben recht weit untereinander wie das aus den Arbeiten von *Abderhalden* und seinen Schülern[3]) an den Ovokeratinen des Huhns und der Scyllium stellare hervorgeht, und auch im Vergleich zu den Daten der Hydrolyse des Caseins[4]). Doch liegt der Gedanke nahe, daß die Überführung der Keratine in resorbierbare Produkte unser Interesse im selben Maße erregen kann, wie das bis vor wenigen Jahren mit der Verwandlung der Cellulosen in Glucose der Fall war. Wies doch seinerzeit der unsterbliche *Johannes Müller* daraufhin, daß die Haare, Pelz usw. fressenden Insekten über Keratin verdauende Fermente verfügen müssen, deren Isolierung von höchstem Interesse wäre. — Vor einigen Jahren gelang es *Zelinski* in Moskau[5]) sämtliche Proteine, also auch Keratine, und selbst ganze

[1]) Chem. Briefe. Leipzig 1865, 154.
[2]) *Oppenheimer*, l. c. S. 278, 333.
[3]) *Abderhalden*, l. c.
[4]) Ebenda.
[5]) *N. D. Zelinski*, Die natürliche u. künstl. Katalyse d. Eiweißstoffe. Z. d. Ver. z. Förderung d. experim. Wissenschaften u. ihrer prakt. Anwendungen zum Gedächtnis Ledenzows in Moskau, 1914, Lief. 2, 15 Seiten.

Organismen durch mehrstündige Erwärmung *mit wenigen Prozent Salzsäure* oder sogar *Ameisensäure*, also ohne Vermittlung von Fermenten, in sog. „Katalysate", lösliche Verbindungen, überzuführen, deren Erforschung noch nicht abgeschlossen ist. Ich wiederholte diese Versuche am Ovokeratin (vgl. obige Tabelle), und es gelang dasselbe mittels 1 proz. Salzsäure bei 90° (auf dem Wasserbade, am Rückflußkühler) in Lösung zu bringen, was allerdings 26 Arbeitsstunden in Anspruch nahm. Man beachte nur, daß die Auflösung des Keratins zu einer hellgelben Flüssigkeit bei einer Temperatur geschah, die nur ca. 53° oberhalb der Temperatur des Körpers liegt. Auch diese Arbeit ist noch nicht abgeschlossen. Des weiteren sei bemerkt, daß *Ssadikow* zurzeit eine sehr eingehende Untersuchung der Produkte der katalytischen Hydrolyse des Roßhaares und der Gänsefedern (nach *Zelinsky*) zum Abschluß bringt. (Mitgeteilt in d. Februar-Sitzung d. russ. physiko-chem. Ges. 1922.)

Daß die Fermente nur Bruchstücke der vollwertigen Proteine sind, ergibt sich aus der Tabelle ohne weiteres. Auch sieht man beispielsweise, daß selbst die *Hefe*, mit der ja zahlreiche Fütterungsversuche angestellt wurden, nicht nur *nicht vollwertig* ist, sondern sogar *abiuret*. Was nun die Toxine, die die französischen Biochemiker ebenfalls als diastatische Fermente auffassen, anbetrifft, so sieht man, daß dieselben im allgemeinen komplizierter zusammengesetzt sind als die Fermente im gewöhnlichen Sinne des Wortes. — Die 2 Präparate des Tuberkulins von *Denys* weisen die merkwürdige Eigenschaft auf, daß sie *abiuret* sind, und *freies Ammoniak* enthalten, während das Tuberkulin von *Koch* bei dem bereits *Armand Gauthier*[1]) feststellte, daß es die Reaktionen von *Millon*, *Adamkewitsch* und die Biuretreaktion gibt, ein vollkommenes Analogon des Caseins repräsentiert, von dem es sich durch seine Löslichkeit in Wasser unterscheidet; diese Analogie äußert sich auch in dem Phosphorgehalt des Alttuberkulins. — Vom *Trypsin* sei bemerkt, daß in der Literatur auch abiuretes Trypsin beschrieben wurde. Offenbar handelt es sich um Präparate verschiedenen Reinheitsgrades.

Es erübrigen noch einige Bemerkungen über Eigenschaften, die direkt aus der Tabelle nicht ersichtlich sind. Die Reaktionen des *Blutfibrins* wurden in 3 Auszügen mittels $^1/_{100}$ proz. HCl, $^1/_{100}$ proz. NaOH und Pepsinsalzsäure ermittelt, worüber ein besonderer Bericht erscheint. — Über den Gehalt des Glutins, Chondrins und Hautpulvers an *Chondroitinschwefelsäure* wird unten kurz berichtet werden. — Das *Elastin* gibt die Reaktion von *Ostromyslenski* nur im alkoholischen Auszug. Dasselbe gilt vom *Papain* und der *Hefe*; wir sehen wiederum Beispiele der Zweckmäßigkeit der Extraktionsmethode in der Proteinforschung.

[1]) *A. Gauthier*, Die Chemie d. leb. Zelle.

— Vom Papain zum Unterschied vom *Pepsin* sei noch bemerkt, daß die das Ferment begleitenden Kohlenhydrate zu den Aldosen gehören, da sie die *Fehling*sche Lösung reduzieren. — Was schließlich das *Pepsin* selbst anbetrifft, so tritt oft die Reaktion von *Ostromyslenski* so schwach auf, daß *Rakusin* und *Iwanow*[1]) seine Zugehörigkeit zu den Proteinderivaten nur durch die qualitative und quantitative Bestimmung des Stickstoffs in üblicher Weise festzustellen vermochten.

Wir haben bereits gesehen, daß man beispielsweise aus der Gelatine durch Abscheidung der sie begleitenden Kohlenhydrate eine Substanz erhalten kann, die nur die Biuretreaktion gibt. In analoger Weise liefert Chondrin eine Substanz, die durch die Biuret- und die Xanthoproteinreaktion gekennzeichnet wird. Ferner sahen wir, daß der in Alkohol unlösliche Teil des Pepsin-Fibrinpeptons nur die Xanthoproteinreaktion und die von *Liebermann* gibt, während dem Elastin durch Alkohol neben den Kohlenhydraten eine Substanz entzogen wird, die nur die Reaktion von *Ostromyslenski* aufweist. Eine ganz analoge Substanz, also mit den Reaktionen von *Molisch* und *Ostromyslenski*, wird beispielsweise dem Alttuberkulin von *Koch* durch $Al(OH)_3$ entzogen. Kurz, es ist nicht schwer, die Proteinstoffe verschiedenen Vollwertigkeitsgrades Schritt für Schritt, Reaktion für Reaktion abzubauen (fraktionieren), worauf a. a. O. näher eingegangen werden soll. Wir zweifeln nicht daran, daß auch der natürliche Abbau der Proteine im Organismus sich wird durch die Farbenreaktionen verfolgen lassen, wie das bis jetzt nach der von *Abderhalden* in Vorschlag gebrachten polarimetrischen Methode der Fall war.

V. Verhalten der Proteine und deren Derivate gegen die Reaktionen auf Schwefel.

(Zur Frage über den Schwefelgehalt der Proteine, den Charakter seiner Bindung und Methoden seiner Bestimmung.)

A. Einleitung.

Zu den wohluntersuchten Schwefelverbindungen der Proteinstoffe gehören bekanntlich Cystin und Chondroitinschwefelsäure. Letztere ist in der Gelatine, der tierischen Haut und dem Chondrin enthalten und soll auch im Amyloid vorhanden sein[2]). Doch fehlt es an genauen Methoden der qualitativen resp. quantitativen Bestimmung der Chondroitinschwefelsäure, während der in Form von Cystin gebundene Schwefel mittels der Schwefelbreireaktion von *Vohl* nachgewiesen wird. Es sei aber hierbei bemerkt, daß nach *Moerner*[3]) nur etwa $^2/_3$ des Cystin-

[1]) Bericht unter der Presse.
[2]) *Oppenheimer*, l. c. S. 328.
[3]) Ebenda S. 395.

schwefels durch das Blei- oder Wismutsalz abgespaltet wird. Das wäre im großen ganzen alles, was über den Schwefelgehalt der Proteine bekannt ist (1914). Im übrigen herrscht auf diesem Gebiet über einige wichtige Fragen noch manches Dunkel. So z. B. ist das Verhalten der Proteine und Fermente gegen die Reaktion von *Vohl* noch nicht ganz vollständig untersucht worden. Ferner sollen „die Peptone als schwefelfrei gelten", während sie nach älteren Angaben von *Moehlenfeld*, *Kistjakowski* und *Kossel*[1]) schwefelhaltig sind. Ich untersuchte 2 Peptonpräparate, hierunter auch Fibrinpepton (s. o.), und fand sie wirklich als schwefelhaltig, was allerdings nicht durch die *Vohl*sche Reaktion, sondern durch *Zusammenschmelzen mit Soda und Salpeter*[2]) gelang, wobei in einem Präparat (von *Brückner*) 0,17% S gefunden wurden.

B. Verhalten der Proteine und Fermente gegen die Reaktionen von Vohl.

Beachtet man, daß der Cystingehalt der Proteine im allgemeinen gering ist und es sich nur bei den Keratinen um größere Cystinmengen handelt, so muß die Reaktion als empfindlich betrachtet werden. Im Einklange mit den Beobachtungen von *Vohl* (s. o.) fanden wir, daß die Schwefelbleireaktion bei allen *typischen Proteinen positiv* ausfällt mit *Ausnahme der Nucleoalbumine* (Casein, Legumin). Demnach erhält man einen schwarzen Niederschlag bei Albumin, Elastin, Fibrin und Ovokeratin, während Chondrin, Gelatine und die meisten Hautpulverproben eine *negative* Reaktion geben. Das wären unsere vorläufigen Beobachtungen an Proteinen.

Von den 6 in obiger Tabelle angegebenen *Fermenten* geben die Schwefelbleireaktion: Pepsin, Papain, Diastase, Pankreatin und Hefe.

C. Qualitativer und quantitativer Nachweis der Chondroitinschwefelsäure.

Wegen der Schwierigkeiten, mit denen die Darstellung der Chondroitinschwefelsäure aus Knorpel usw. verbunden ist, war dieselbe bis vor kurzem nur in amorphem Zustande bekannt, und deshalb fehlte es an Angaben über die physikalischen Konstanten dieser Säure. Mir gelang die Darstellung der *reinen Säure* durch Einwirkung von Aluminiumhydroxyd auf eine wässerige Lösung von Chondrin bei einer Konzentration nicht über 0,2%, und zwar durch Stehenlassen im Laufe von 24 Stunden bei Zimmertemperatur: es findet unter diesen Bedingungen offenbar eine gelinde Hydrolyse statt, bei der im Filtrat *quantitativ* Chondroitinschwefelsäure abgeschieden wird, weil es keine einzige der Farbenreaktionen des Chondrins (vgl. Tabelle) aufweist, und *nur mit Chlorbarium* einen weißen Niederschlag gibt und außerdem

[1]) *Hoppe-Seyler*, Physiol. Chemie, 1879, 1. Teil.
[2]) *Oppenheimer*, l. c. S. 9.

optisch aktiv, und zwar *linksdrehend* ist. Das wären gleichzeitig auch die *2 qualitativen Reaktionen* der Chondroitinschwefelsäure.

Die Reaktion wird wie folgt ausgeführt: 2 g $Al(OH)_3$, welches im Wasserschrank bis zum konstanten Gewicht getrocknet wurde (man hält davon einen Vorrat bereit), werden in einem Probierglas mit 20 ccm der zu untersuchenden Lösung übergossen, wonach das Gemisch in verkorktem Probierglase 24 Stunden stehengelassen wird. Im Falle des *Chondrins* soll c = 0,2 (Maximum) sein, weil bei größeren Konzentrationen die Reaktion ganz anders verläuft, worauf a. a. O. näher eingegangen werden soll. Aus der äußerst stark opalescierenden Lösung (deshalb war auch die Reaktion mit $BaCl_2$ unausführbar!) erhält man am nächsten Morgen eine völlig klare Lösung, die auf ein Faltenfilter abgegossen wird.

Die Säure, deren Schwefelgehalt der von *Schmiedeberg*[1]) aufgestellten Formel entspricht, weist folgende *Eigenschaften* auf: sie ist mikrokrystallinischer Struktur (s. o.), schmilzt gegen 180° unter Zersetzung, und ist: $[\alpha] = -46{,}59°$ (H_2O), während man früher, als man mit amorpher Substanz operieren mußte, sogar Rechtsdrehung annahm[2]), was man als scheinbare Ausnahme der *Hoppe-Seyler*schen Regel von der Linksdrehung der natürlichen Proteine betrachtete.

Zuletzt sei bemerkt, daß die Isolierung der Chondroitinschwefelsäure nach obiger neuen Methode noch insofern von Interesse ist, als das Schicksal dieser Säure bei der durchgreifenden Hydrolyse der Gelatine usw. vorläufig nicht bekannt ist. Indessen enthält beispielsweise das Chondrin (s. o.) 51,71% Chondroitinschwefelsäure.

D. Gleichzeitige Bestimmung von Schwefel und Stickstoff in Proteinen.

(*Über eine in Vergessenheit geratene Reaktion von Michailow.*)

Hat man Stickstoff neben Schwefel zu bestimmen, wie das bei Proteinen und deren Derivaten der Fall ist, so verfährt man bekanntlich derart, daß man die fragliche Substanz mit metallischem Kalium oder Natrium erhitzt und in einer Hälfte der Probe nach *Lassaigne* Stickstoff mittels Eisenchlorid und Eisenvitriol usw. bestimmt, während man in der anderen Hälfte Schwefel qualitativ nach *Vohl* durch die auf Zusatz von Nitroprussidnatrium auftretende blauviolette Färbung ermittelt.

Es gibt aber in der Literatur eine leider der Vergessenheit anheimgefallene, empfindliche Reaktion von *Wladimir Michailow*[3]), die es gestattet, die qualitative Prüfung auf Stickstoff und Schwefel in einer Probe durchzuführen. Wir lassen nun die Beschreibung der Reaktion im Wortlaut des Erfinders folgen: „Zu einer geringen Menge einer

[1]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 1891, S. 354.
[2]) *O. Cohnheim,* Die Chemie d. Eiweißkörper. Braunschweig 1900, S. 263.
[3]) *W. Michaillow,* Journ. d. russ. physiko-chem. Ges. **16**. 588. 1884.

Eisenvitriollösung wird die zu prüfende Substanz zugesetzt, die in spe N und S enthält; das Gemisch wird mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt und alsdann wird vorsichtig ein Minimum konzentrierter Salpetersäure zugesetzt. Dann entsteht neben dem braunroten, das aus dem Eisenvitriol gebildete Ferrisalz enthaltenden Ring ein blutroter Ring von Rhodaneisen. Letzteres entstand offenbar auf Kosten der durch die Schwefelsäure aus den Proteinen ausgeschiedenen Rhodanwasserstoffsäure einerseits und dem durch Salpetersäure oxydierten Eisenvitriol andererseits." „Die Reaktion ist empfindlich, und ist daher eine schwach Rosa-Färbung nicht zu beachten, da eine solche auch bei der direkten Gegenwirkung der Reagentien entsteht."

Man sieht also, daß die Reaktion zunächst, wie bei der Prüfung auf HNO_3 verläuft, und daß der Rhodanring auf Zusatz eines Minimums konzentrierter Salpetersäure auftritt. Als solches Minimum gilt ein in konzentrierter Salpetersäure eingetauchter Glasstab, von dem der an ihm hängende Tropfen bereits ablief. Nach einiger Übung gewöhnt man sich an die Reaktion ganz gut. Wir prüften die Reaktion an fast allen in obiger Tabelle angeführten Proteinen und Fermenten, und zwar mit gutem Erfolg. Besonders überzeugend war das Ausbleiben der Reaktion bei Harnstoff im Gegensatz zum Thioharnstoff, sowie beim Agar-Agar im Gegensatz zur Gelatine. Agar-Agar erwies sich beim Erhitzen mit Natrium als stickstofffrei, und so überzeugt man sich ein übriges Mal, daß Agar-Agar lediglich aus Kohlenhydraten besteht.

Es sei zuletzt bemerkt, daß die eben beschriebene Reaktion nur eine der vielen anderen schönen biochemischen Arbeiten des viel zu früh verschiedenen *Michailow* repräsentiert, die wir aus der Vergessenheit zogen und in einer besonderen Mitteilung den Fachgenossen bekannt zu geben gedenken. U. a. gehört *Michailow* die beste Methode der Darstellung von reinem Albumin, auf die *Ladenburg* in seinem Handb. d. Chemie hinweist, und woher wir auch auf die Arbeiten *Michailows* kamen.

Auch die 2 erwähnten Peptonproben wiesen die Reaktion von *Michailow* auf.

VI. Schlußbetrachtung.

Fassen wir nun alles über die Proteinreaktionen Gesagte zusammen, so sehen wir, daß dieselben in 3 Gruppen einzuteilen sind, und zwar: 1. Stickstoffreaktionen, 2. Kohlenhydratreaktionen und 3. Schwefelreaktionen. Jedem Proteinstoff entspricht ein ganz bestimmter *Komplex von Reaktionen*, der ihn nicht nur recht gut charakterisiert, sondern in manchen Fällen, wie beim Chondrin usw., angibt, wie die *vollständige Analyse* auszuführen ist. Es ist nach obigem einleuchtend, daß eben bei Substanzen, die Chondroitinschwefelsäure enthalten, letztere vor

der Ausführung der durchgreifenden Hydrolyse der Substanz mittels $Al(OH)_3$ zu beseitigen ist. Man sieht also, daß die Kenntnis der besprochenen 10 Proteinreaktionen und die Daten der in üblicher Weise, nach *Emil Fischer* und *Emil Abderhalden*, ausgeführten Hydrolyse einander aufs Beste ergänzen.

Zuletzt möchten wir bemerken, daß wir die Arbeit in beschriebener Richtung an den Geweben und Organen der Tiere und des Menschen, sowie den Drüsen und deren Abscheidungen fortsetzen. Doch sei hierbei ausdrücklich betont, daß nichts auf diesem dankbaren und unerschöpflichen Arbeitsgebiet reserviert wird: je mehr Fachgenossen sich daran beteiligen werden, in desto rascherem Tempo wird sich unsere schöne Disziplin zum Wohl der Menschheit weiter entwickeln.

Über den Zusammenhang zwischen Adsorption und elektrolytischer Dissoziation.

Von

M. A. Rakusin.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium des staatlichen wissenschaftlich-technischen Institutes zu Petersburg.)

(Eingegangen am 8. Februar 1922.)

I. Einleitung.

Daß *poröse Substanzen* in wässerigen Lösungen negative Adsorption hervorrufen, d. h. nicht einen Teil der gelösten Substanz, sondern das Lösungsmittel, Wasser, aufnehmen, bewies *Lagergreen*[1]) bereits 1899. Er stellte nämlich fest, daß bei Berührung von gelösten Chloriden mit Kohle, Kaolin, Glaspulver usw. negative Adsorption stattfindet. Diese merkwürdigen Beobachtungen *Lagergreens* scheinen den früheren Beobachtungen von *Quincke*[2]) und *Gerstmann*[3]) zu widersprechen, während *Thoulet*[4]) seinerzeit in den erwähnten Fällen ebenfalls negative Adsorption beobachtete. *Thoulet* wies nämlich nach, daß die Konzentrationen einer Lösung, mit der feste Körper, z. B. suspendierte Teile, in Berührung sind, an der Oberfläche dieser Körper größer sind als an anderen Stellen der Flüssigkeit. Ist daher in der Flüssigkeit ein *Elektrolyt* gelöst, so umhüllen sich die suspendierten festen Teilchen mit einem Flüssigkeitsmantel von höherer Konzentration, werden hierdurch schwerer und sinken zu Boden. Die Divergenz der Beobachtungen von *Quincke* resp. *Gerstmann* mit den von *Lagergreen* soll, nach *W. Ostwald*[5]), auf kompliziertere Konzentrationseinflüsse, wie bei Quellungserscheinungen, zurückzuführen sein.

Ansichten, die den von *Thoulet* analog sind, spricht auch u a. *Nernst*[6]) aus, der die Erscheinungen der negativen Adsorption mit der Wärmentwicklung in Zusammenhang bringt, die man beim Benetzen feinverteilter Stoffe mit Wasser beobachtet. Was nun die von *W. Ostwald*

---

1) *W. Ostwald*, Grundr. d. Kolloidchem. Dresden 1909, S. 406.
2) Ebenda; *Arth. Mueller*, Die Theorie d. Koll. 1903. S. 37.
3) *W. Ostwald*, l. c.
4) *Mueller*, l. c.
5) *Ostwald*, l. c.
6) *W. Nernst*, Theoret. Chem. Stuttgart 1900, III. Aufl., S. 129.

gezogene Analogie zwischen negativer Adsorption im Sinne von *Lagergreen* resp. *Thoulet* und den Quellungserscheinungen anbetrifft, so kann ich dieselbe nur teilen und soll hierauf a. a. O. näher eingegangen werden.

II. Verhalten des Kaolins gegen Lösungen von Krystalloiden.

Bei meinen früheren zahlreichen Adsorptionsstudien habe ich mich, im Einklange mit den Ansichten von *Michaelis*[1]) und *Artur Müller*[2]) zur Genüge überzeugen können, daß nur gelöste Kolloide (amorphe Stoffe) von kolloidalen Adsorbentien, wie z. B. $Al(OH)_3$ irreversibel aufgenommen werden, und zwar unter Bildung von Adsorptionsverbindungen, die ich, der Einfachheit halber, *Adsorbate* nennen möchte. Mithin gehören in das Gebiet der negativen Adsorption durch poröse Stoffe lediglich *Krystalloide*, mit denen ich mich auch im Anschluß an die Arbeiten früherer Forscher, die sich nur auf Elektrolyte erstreckten, zu operieren entschloß.

Nach vielen *vergeblichen* Versuchen, die Beobachtungen *Lagergreens* zu bestätigen, kam ich endlich in Gemeinschaft mit *S. N. Kowarski*[3]) zu folgenden *merkwürdigen* Resultaten, die nicht nur die Richtigkeit der Ansichten von *Lagergreen* u. a. bestätigen, sondern auch zu anderen überaus wichtigen und zugleich unerwarteten Schlüssen führten. Die Versuche wurden mit wässerigen Lösungen von *Chlornatrium* resp. *Rohrzucker* ausgeführt, und diente uns als Adsorbens ein Bruchstück eines *Tontellers*, wie solche im Laboratorium zur Befreiung der Krystallmassen von anhaftender Mutterlauge im Gebrauche sind. Die Adsorption selbst wurde nach meinem üblichen Schema (24 Stunden usw.) ausgeführt, wobei folgende Resultate erzielt wurden:

Nr.	Lösungen von	c	c′	Anmerkungen
1	Chlornatrium	1,86	2,74	Hier bedeuten c und c′ die Konzentrationen VOR und NACH der Adsorption. Lösungsmengen = 20 ccm; Kaolinmengen = 0,6 g; T = 9° C.
2	Rohrzucker	1,90	2,54	

Man sieht, wie groß die Steigerung der Konzentration in beiden Fällen war, unabhängig davon, ob in Lösung ein Elektrolyt oder *Nichtelektrolyt* war. Es wurde also vom Kaolin in beiden Fällen lediglich Wasser aufgenommen („eingesaugt").

Auf die beschriebenen Versuche kam ich durch folgende *zufällige*, überaus merkwürdige Beobachtungen: in der Absicht mir eine Natriumflamme für das Polarimeter von *Laurent* zu schaffen, da während des Krieges eine Natriumlampe nicht zu kaufen war, brachte ich ein Bruchstück eines Tontellers (Bimsstein konnte ich nicht bekommen) in einen

1) *Ostwald*, l. c. S. 416.

2) *Mueller*, l. c. S. 49.

3) *M. Rakusin* und *S. Kowarski*. Üb. d. Adsorption v. Krystalloiden mittels Kaolins. Mitt. üb. wiss.-techn. Arb. in. d. Republ. Petrogr. 1920, S. 107.

Gasbrenner mit schlitzförmiger Öffnung, und glaubte das Bruchstück durch Tränken mit einer Chlornatriumlösung (s. o.) zur Erzielung eines homologen Natriumlichts benutzen zu können. Zu unserer größten Verwunderung bemerkten wir, daß durch das Hineinbringen des *noch feuchten Bruchstückes* in die Gasflamme in derselben *keine Spur Natrium* vorhanden war. Wenn man nur bedenkt, wie empfindlich speziell die Flammenreaktion des Natriums ist, wird man begreifen, wie groß unser Erstaunen war, als wir diese Erscheinung zuerst beobachteten, und nachher dieselbe vor anderen mehrmals demonstrierten.

III. Schlußfolgerungen.

Das *Lagergreen*sche *Phänomen* ist somit unwiderleglich bewiesen. Wie haben wir uns nun dasselbe zu *erklären*? Diese Frage läßt sich wie folgt beantworten: in Lösungen von *Elektrolyten* sind bei genügender Verdünnung nicht die Salze, sondern die entsprechenden *Ionen* vorhanden, die, wie wir schon wissen (a. a. O.), *nicht adsorbiert werden*. Bereits *Freundlich*[1]) wies darauf hin, daß „Neigung zur Dissoziation die Adsorption hemmt". Jetzt aber ist es vielmehr einleuchtend, daß *bei elektrolytisch dissoziierten Substanzen jede Möglichkeit einer Adsorption überhaupt ausgeschlossen wird*, da der Adsorption nur undissoziierte Molekel unterliegen, wie das bei *kolloiden* Lösungen der Fall ist, weshalb solche, falls sie keine Elektrolyte sind, auch *irreversible* Adsorptionen aufweisen.

Während des Druckes dieser Zeilen vermochte ich eine Mitteilung von *W. Kraus*[2]) zu lesen, in der die Untersuchungen über das „*Bechhold*sche Kapillarphänomen" fortgesetzt werden. Dieses Phänomen besteht nämlich darin, daß bei Versuchen mit Kieselgur, unglasiertem Porzellan usw. aus Salzlösungen, mit denen jene Körper getränkt waren, das Salz, z. B. $CuSO_4$, beim Trocknen sich an der Oberfläche anreichert, während *im trocknen Kern keine Salze* mehr nachzuweisen sind. Man sieht ohne weiteres, daß *auch das Bechholdsche Phänomen in der Theorie der elektrolytischen Dissoziation seine Erklärung findet*, und dieselbe ebenfalls ad oculus demonstriert.

Die irreversiblen Adsorptionen von Kolloiden liefern somit gewissermaßen ein *Experimentum crucis;* sie sind geeignet nicht nur ein übriges Mal die Richtigkeit der Theorie der *elektrolytischen Dissoziation* zu beweisen, sondern auch ad oculos zu demonstrieren. Vielleicht aber wird hierdurch der überaus kleine Dissoziationsgrad des sehr *reinen Wassers* bewiesen[3]), ja vielleicht verhält sich die *assoziierte Molekel des Wassers*[4]) wie ein *Kolloid* und wird *deshalb adsorbiert* („eingesaugt").

---

1) Zeitschr. f. physik. Chem. **57**, 385ff. 1907.

2) Kolloid-Zeitschr. 1921, 161; hierselbst Literatur.

3) *Nernst*, l. c. S. 475—477 u. 642; *Arrhenius*, Theorien d. Chem. Nach Vorles. an. d. Kaliforn. Univ. Berk. (Russ. Übers. St. Pet. 1907, S. 71.)

4) *Nernst*, l. c.; S. 265; *Arrhenius*, l. c. 71, 153—154. Kap. XIII.

Als weitere notwendige Konsequenz unserer Betrachtungen ergibt sich der wichtige Schluß, daß auch die *Nichtelektrolyte*, wie Rohrzucker[1]) u. a. Krystalloide, *entweder* einer eigentümlichen Dissoziation unterworfen sind, die auf anderem, also nichtelektrolytischem Wege nachzuweisen wäre, *oder* die Annahme, die seinerzeit *Helmholtz*[2]) machte, daß alle chemischen Verbindungen überhaupt Elektrolyte sind, welche von neuem einer experimentellen Kritik unterzogen werden muß. Ohne weiteres ist diese Annahme allerdings nicht aufzugeben, denn sie hat nicht nur historisches und philosophisches Interesse, sondern es ist wohl anzu nehmen, daß sie der strengsten experimentellen Kritik widerstehen wird.

Zum Schluß dieser kurzen Mitteilung muß ich bemerken, daß ich nicht genug die Freude ausdrücken kann, daß es mir, wenn auch nach vielen vergeblichen Versuchen mit Kaolin, Spodium usw. endlich doch gelungen ist nicht nur die Richtigkeit der Theorien der *negativen Adsorption* und der *elektrolytischen Dissoziation* zu beweisen, sondern auch deren innigen *Zusammenhang* festzustellen, was ganz außerhalb des Rahmens der Aufgabe steht, die ich mir ursprünglich stellte. Es ist aber hier auch meine Pflicht, eines der genialen Schöpfer der *physiologischen Chemie*, *Hoppe-Seyler*, ehrfurchtsvoll zu gedenken, dessen Ideen mich zu den hier beschriebenen Versuchen und theoretischen Schlußfolgerungen führten. In seiner „*Physiologischen Chemie*" Bd. I[3]) unterscheidet der Meister zwischen „Einsaugen" ohne Vergrößerung des Volumens (bei Gips, Marmor usw.) und „Quellung" (bei tierischer Blase, Pergamentpapier usw.). Dementsprechend sollen auch die Erscheinungen der *negativen Adsorption eingeteilt* werden, und sollen eben die hier noch nicht besprochenen, durch Quellung hervorgerufenen negativen Adsorptionen Gegenstand einer der nächsten Mitteilungen sein. Nicht minder wertvoll für unsere Betrachtungen erscheinen die Ansichten *Hoppe-Seylers* über Filtration, Transsudation und Osmose, die er mit Recht mit den Quellungserscheinungen in Zusammenhang bringt. Bei der Besprechung der Filtration weist er ausdrücklich darauf hin, daß die *Lösungen von Eiweiß und Gummi keine wahren Lösungen sind*. Sein Scharfsinn und seine Weitsichtigkeit diktierten es ihm also, daß die Proteine und Gummistoffe, deren Kenntnis für die Chemie der lebenden Zelle von so hoher Bedeutung ist, nicht gelöst, also in heutigem Sinne des Wortes nicht dissoziiert sind. Zu diesem wichtigen Schluß bringt uns auf mühevollem Wege über 40 Jahre später die moderne Adsorptionslehre, von deren segenreichem Einfluß auf die reine und angewandte Chemie wir uns noch öfters überzeugen werden.

[1]) *Nernst*, l. c., S. 343.

[2]) *H. Helmholtz*, Wiss. Abhandlungen. Leipzig 1895, **3**, 52; zit. n. *Arrhenius*, l. c. S. 51—52.

[3]) *F. Hoppe-Seyler*, Physiologische Chemie, **1**, 171, 175 u. 184. (Zit. n. d. russ. Übers. v. Prof. A. Bulyginski, Moskau 1878).

Über eine Modifikation des Mikrorespirationsapparates.

Von

Bohumil Krajník.

(Aus dem Laboratorium für Zoologie und Tierstoffkunde an der böhmischen Technischen Hochschule in Brno [Č. S. R.].)

(Eingegangen am 20. März 1922.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

In der letzten Zeit wurden verschiedene Modifikationen der Mikrorespirationsapparate, welche zur Analyse des Gaswechsels bei den niederen Organismen dienen, beschrieben. Ich gebe hier die Beschreibung einer neuen Modifikation des Mikrorespirometers, welches auf Grund der Vereinigung der Prinzipien der Mikrorespirationsapparate *Wintersteins* und *Kroghs* konstruiert ist.

Der Mikrorespirationsapparat von *H. Winterstein* beruht auf einer Kombination der Prinzipien, die den gasanalytischen Methoden von *Barcroft* und *Haldane* einerseits und *Peterson* andererseits zugrunde liegen (1912). Man kann mit ihm den Sauerstoffverbrauch sicherstellen und die Respirationsquotienten der kleinen Organe oder der kleinen Organismen bestimmen. Der Apparat besteht aus 2 Fläschchen, welche miteinander durch eine, mit einer Millimeterteilung versehene, wagerechte Capillare kommunizieren, in der ein als Index dienendes Petroleumtröpfchen (es kann gefärbt werden) enthalten ist. Das rechts befindliche Fläschchen ist der Kompensator, das andere ist das eigentliche Analysengefäß, welches das zu untersuchende Objekt enthält. Das Analysengefäß steht einerseits mit der Indexcapillare, andererseits mit einer kleinen Quecksilberbürette in Verbindung, dessen dem Apparat zugekehrter Schenkel aus einer feinen in Kubikmillimeter geteilten Capillare besteht, während der andere, breitere, nach oben gewendete Schenkel einen mit einem Glasstopfen verschlossenen Gummischlauch trägt. An diesem befindet sich eine Schraubklemme, welche die Veränderung des Luftraumes über dem Quecksilber gestattet. Auf den Glasstöpseln hängen kleine Schälchen. In die Verbindung der Indexcapillare mit den Fläschchen sind auf beiden Seiten Dreiweghähne eingeschaltet. Der Apparat wird ins Wasserbad versenkt, das Wasser wird dann stets während des Versuches gründlich gemischt. Wenn dann eine Volumveränderung in einem Fläschchen eintritt, wird der Druck in demselben verändert und damit auch der Index verschoben. Diese Verschiebung ist direkt proportional der Volumveränderung. *Winterstein* hat durch die Verbindung der Quecksilberbürette mit einem Fläschchen erreicht, daß man diese Volumveränderung, wenn die Indexverschiebung wieder auf die Grundstellung ausgeglichen wird, direkt ablesen kann. Jegliche Berechnungen kommen hier in Fortfall. Als Absorptionsflüssigkeit für CO_2 benützt man meistens 2proz. KOH oder NaOH.

Die Veränderungen, welche *Winterstein* an dem Apparate später (1913) durchgeführt hat, waren folgende: Die Fläschchen haben eine kugelige Form; die Stopfen der Fläschchen sind mit einer bis über den Spiegel des Wasserbades führenden, durch einen Hahn verschließbaren Bohrung versehen, die bei entsprechender Stellung der Hähne ein Durchleiten von Gasen durch die Fläschchen und so die Untersuchung der Atmung bei verschiedenem Sauerstoffdruck gestattet und endlich wurde eine Schüttelvorrichtung beigefügt, welche nicht nur das Wasser im Wasserbade mischt, sondern auch für die Durchmischung der in den Fläschchen enthaltenen Flüssigkeiten sorgt. Man kann diesen, in solcher Weise eingerichteten Apparat auch zur Bestimmung des Wasserstoffes und des Methans in den von Bakterien produzierten Gasen verwenden, wie dies *J. Bečka* in seiner Arbeit getan hat.

August Krogh hat seinen Mikrorespirationsapparat im Jahre 1914 beschrieben. Dieser Apparat besteht aus einem mit Millimeterskala versehenen, capillären Manometer. Die beiden Schenkel der Manometerröhre sind oben mit dickwändigen Kautschuckschläuchen versehen und können mittels eines Schraubenquetschhahnes verschlossen werden. Nach hinten ist jeder Manometerschenkel mit einer Zweigröhre versehen; hierdurch wird er mittels Kautschukschlauch mit dem Tierbehälter resp. Kontrollbehälter in Verbindung gesetzt. Das Manometer ist zum Aufhängen an der Wand von Wasserbädern eingerichtet. Die Tierbehälter können gewechselt werden, und man kann für jedes Tier, an dem man Bestimmungen zu machen wünscht, einen entsprechenden Behälter finden oder einrichten. Man sucht sich 2 Behälter von möglichst gleichem Volumen aus; sie werden mit der gleichen Menge von 2 proz. Lauge versorgt und in dem einen wird das Versuchstier eingebracht. Dann werden sie sorgfältig verschlossen, an den beiden Schenkeln des Manometers aufgehängt und soweit belastet, daß sie ins Wasser hinuntersinken. Nachdem die beiden Behälter in Wasser von konstanter Temperatur gebracht worden sind, wartet man wenigstens eine Viertelstunde, bevor man den Apparat verschließt, damit Temperaturgleichheit eintreten kann. Nachdem das Manometer verschlossen ist, liest man zu bestimmter Zeit den Stand ab und wiederholt die Ablesung in passenden Zeitintervallen. Jede Ablesung (die erste ausgenommen) gibt mit der zugehörigen Zeitdifferenz dividiert eine Bestimmung der Sauerstoffabsorption. Die Berechnung der Sauerstoffabsorption erfolgt dann nach der komplizierten mathematischen Formel, deren Erklärung und Zusammensetzung *Krogh* in seiner Arbeit wiedergibt.

In der neuesten Zeit (1920) hat *Adam Neil-Kensington* eine neue Modifikation des Mikrospirometers von *Barcroft* und *Winterstein* veröffentlicht. Sein Apparat besteht im Prinzip aus 2 Behältern, welche miteinander durch ein Capillarmanometer verbunden sind und einer kalibrierten Quecksilberröhre. Im Manometer befindet sich ein Paraffinöltröpfchen mit dem Siedepunkt 160—190°. Die Ablesung der Quecksilberbürette gibt direkt das durch Gewebe absorbierte Gasvolumen, die Korrektion für den Druck und die Temperatur und zwar für die im Moment des Apparatabschlusses herrschenden Bedingungen. Es ist das also im Grundprinzip ein *Barcroft*sches Differenzmanometer mit der Hinzufügung der Quecksilberbürette des Mikrorespirometers von *Winterstein*. Das Respirationsgefäß kann so eingerichtet werden, daß man im Inneren desselben ein Gewebe aufhängt, welches mittels eines elektrisches Stromes gereizt werden kann. Jedes Gefäß ist mit einer für den Ausgang für das Gas, im Falle der Füllung, dienenden Röhre mit Hahn versehen. Die Behälter sind mit dem Manometer und der Quecksilberbürette mittels genauer Schliffe verbunden. Dort, wo das Manometer in die nach hinten abzweigenden Schenkel eingeschmolzen ist, befinden sich auf beiden Seiten Glasdreiweghähne. Auch die Quecksilberröhre ist mit einem Hahn ver-

sehen. Mit diesem Apparat hat der Autor den Sauerstoffverbrauch z. B. eines ruhenden Sartorius von Frosch gemessen und gefunden, daß die Exaktheit zwischen 2% und 3% schwankt.

Ich gehe jetzt zur Beschreibung meines Apparates und zur Erklärung seiner Vorteile über. Dieser Apparat besteht aus einer Manometervorrichtung wie *Kroghs* Apparat (Abb. 1 u. 2); in dieser Capillare befindet sich ein Indextröpfchen, d. h. das reinste, destillierte, verkäufliche, amerikanische, mit Sudan gefärbte Petroleum (Siedepunkt 163—204°); die Lichtweite dieser Capillare beträgt 0,618 mm. Oben sind auf beide Schenkel dickwändige Gummischläuche angesetzt, welche man mittels einer Schraubklemme abschließen kann. Etwa in der Entfernung eines Viertels vom oberen Rande zweigen von diesem Indexmanometer auf beiden Seiten die Zweigröhren nach hinten ab. Auf die Zweigröhren ist auf jede von beiden ein dickwandiger Gummischlauch angesetzt; in diesen kann man auf beiden Seiten je ein Gefäß hineinpassen. An den linken, nach hinten abzweigenden Schenkel ist von vorn eine Quecksilberbürette angeschmolzen. Ihr linker Schenkel ist eine Capillare von 1,27 mm Lichtweite, der rechte Schenkel ist eine

Abb. 1. Ansicht von vorne in der vertikalen Lage.

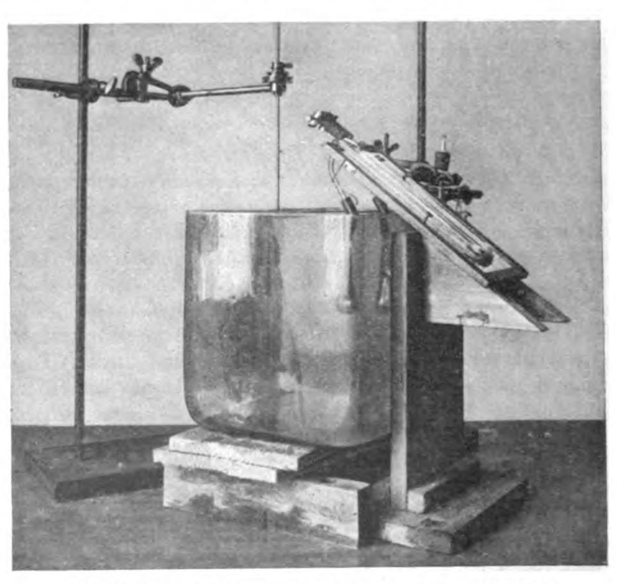


Abb. 2. Ansicht auf die ganze Einrichtung von der Seite.

breitere, als Reservoir für Quecksilber dienende Röhre. Dieser trägt einen dickwandigen Gummischlauch, in welchem am Ende eine Vorrichtung aufmontiert ist, welche uns die Luftraumveränderung über dem Quecksilber gestattet. Das Indexmanometer und die Quecksilberbürette sind auf der vorderen Seite auf einer Spiegelplatte befestigt; diese ist mit einer Skala für das Quecksilber und den Petroleumindex versehen. Die Platte ist in eine andere hölzerne Platte eingesetzt, welche, um das Werfen derselben zu verhindern, zusammengesetzt ist. Auf beiden Seiten des Randes der hölzernen Platte befinden sich in der Mitte 2 Schrauben, oben 2 Halter.

Man kann Gefäße von verschiedener Form benützen. Ich habe mit Behältern von 35 ccm Inhalt (Abb. 3), von birnenförmiger Gestalt mit möglichst breitem Boden gearbeitet. Die Glasstopfen sind eingeschliffen. Die Form des Glasstöpsels ist aus der Abb. 4 ersichtlich.

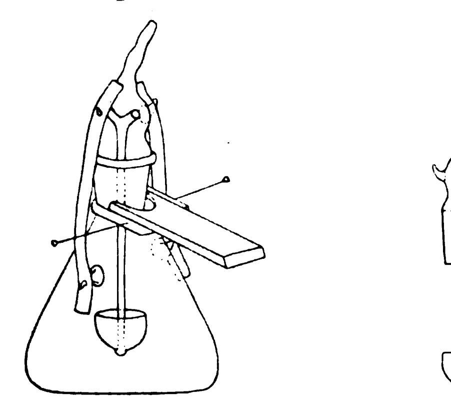


Abb. 3. Das Gefäß. Abb. 4. Der Glasstöpsel des Gefäßes.

Die Dimensionen des Apparates, mit welchem ich eine ganze Reihe von Versuchen durchgeführt habe, sind folgende: Beide Schenkel des Indexmanometers haben die Länge (gemessen von der Mitte der unteren Biegung bis zur Mündung) 25 cm. Der linke Schenkel der Quecksilberbürette ist 22,5 cm, der rechte (Reservoir) 15 cm und 4,5 cm (der nach rechts gebogene Teil) lang.

Die Gefäße haben am Unterteil auf beiden Seiten kleine Vorsprünge, die Stöpsel ebenfalls. Bei der Arbeit mit dem Apparate werden die Glasstöpsel zuerst mit passendem Hahnfett ordentlich bestrichen; die Behälter werden dann der Vorschrift nach abgeschlossen; dann werden auf jeder Seite die Vorsprünge mit Gummistreifen verbunden. Um die Gefäße stets in derselben Entfernung von der Aquarienwand zu halten, ist der Hals jedes Gefäßes draußen mit einem Gummistreifen versehen; auf denselben befestigt man eine zweckmäßig eingerichtete, hölzerne Platte. Man arbeitet mit dem Apparat so, wie mit dem Respirometer

von *H. Winterstein*. Die Organismen werden in ein Gefäß hineingelegt, das andere bleibt, wenn es sich um Landtiere handelt, leer; wenn es Wasserorganismen sind, gibt man in jedes Gefäß eine gleiche, kleine Menge Wasser. In die auf den Glasstöpseln befestigten Schälchen schiebt man ein mit abgemessener Menge von KOH vollgesaugtes Filtrierpapier hinein oder man läßt sie leer. Wenn man in die Gefäße keine Lauge gibt, dann wird CO_2 nicht absorbiert und die Indexbewegung zeigt die Differenz zwischen der O_2-Absorption und CO_2-Produktion. Wenn man dann den Versuch mit demselben Tier mit der Lauge macht, kann man aus beiden Versuchen den Respirationsquotienten ausrechnen. Der Respirationsquotient $Q = \frac{CO_2}{O_2}$; durch die erste Messung (ohne Lauge) erhalten wir: $O_2 - CO_2 = a$, durch die zweite bekommen wir: $O_2 = b$; daraus $CO_2 = b - a$, also $Q = \frac{b-a}{b}$. Die gut abgeschlossenen Behälter werden in ein Wasserbad, in welchem das Wasser fortwährend gerührt wird, versenkt. „Die Behälter wähle man immer dünnwandig und von möglichst runder Form, um die Temperaturkonstanz und die Gasdiffusion im Innern zu fördern“ (*Krogh*). Der linke Schenkel der Quecksilberbürette ist ein für allemal kalibriert (in meinem Falle ein Durchschnittsteilstrich = 1,318 cmm).

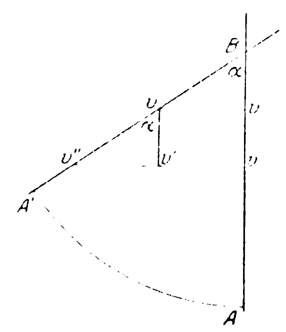


Abb. 5. Die Abhängigkeit der Empfindlichkeit von der Neigung der Indexcapillare. $VV' = H$, $VV'' = h$, AB = Indexcapillare in der vertikalen Lage. $A'B$ = dieselbe geneigt um $\sphericalangle \alpha$.

Die Versuche kann man so durchführen, daß man den Apparat einfach vertikal auf die Aquarienwand aufhängt; die Gefäße befinden sich tief im Wasser, die übrigen Teile sind draußen. Um aber die Empfindlichkeit des Apparates zu erhöhen, benütze ich ihn in einer geneigten Lage und zwar so, daß die Vertikalkathete = 10 cm, die Horizontalkathete = 15 cm. Wenn man die vertikale, durch einen bestimmten Druckunterschied in den beiden Behältern hervorgerufene Niveaudifferenz in beiden Schenkeln der Indexcapillare H und die in der Ebene des Maßstabes, auf der Skala abgemessene Niveaudifferenz h bezeichnet, dann folgt aus der Abb. 5 die Beziehung: $h = \frac{H}{\cos \alpha}$. Daraus ist die Abhängigkeit der Empfindlichkeit von der Neigung der Indexcapillare ersichtlich. Nach einer sorgsamsten Messung mit meinem Apparate in dieser geneigten Lage habe ich gefunden, daß der Verschiebung von 10 Teilstrichen des Quecksilbers im linken Schenkel der Quecksilberbürette die Verschiebung von 3 Teilstrichen des Index entspricht. Ich selbst habe aus Ersparnisgründen als Unterlage einen

hölzernen Keil benutzt. Zweckmäßiger kann man die Neigung des Apparates in der Weise erzielen, daß der Apparat auf einer Platte befestigt wird, welche man längs eines Metallhalbkreises (in der Richtung AA' in der Abb. 5) verschieben kann. Auf diesem Halbkreise können dann direkt die Werte von $\frac{1}{\cos\alpha}$ eingetragen werden. Alle Berechnungen, welche bei *Kroghs* Apparat nötig sind, kommen hier in Fortfall. Das Sauerstoffvolumen liest man direkt auf Grund der Quecksilberverschiebung, die zur Einstellung des Index in die konstante Grundstellung nötig ist, ab. Die empfindlichste Grundstellung des Index ist diejenige, bei der beide Indexmenisken dieselbe Horizontalebene berühren, eine Stellung, die sich von selbst einstellt, wenn beide Manometerschenkel mit der Außenluft kommunizieren. Die Genauigkeit, mit welcher man die Grundstellung abschätzen kann, schwankt um $+0{,}1$ des Teilstriches. Zu dieser Zahl bin ich auf Grund einer großen Reihe von Messungen gelangt. Es ist selbstverständlich, daß man sorgsam darauf achten muß, daß die Temperatur des Wasserbades und die Temperatur des Laboratoriums möglichst gleich sind. Der Unterschied darf nicht 1° übersteigen. Man kann noch die Anmerkung hinzufügen, daß man sich den Ausdruck Quecksilbermanometer, soweit ihn *Winterstein* benützt, eigentlich im Sinne der Bürette zu denken hat, weil man mittels dieser Röhre die Volumveränderung und nicht den Druck mißt.

Die Vorteile dieses Apparates sind, kurz zusammengefaßt, folgende: Der Apparat hat keine Hähne; damit kommen die langweiligen Manipulationen und die eventuellen, aus dem Einfetten und dem Gebrauche der Hähne entstehenden Fehlerquellen in Fortfall. Die Behälter kann man abmontieren; man kann für verschiedene Organismen und Gase verschieden eingerichtete Gefäße benützen; auch ihre Reinigung ist sehr erleichtert. Die Empfindlichkeit des Apparates ist bedeutend groß. Bei nur wenig Aufmerksamkeit zerreißen weder der Petroleumindex, noch die Quecksilbersäule. Das Anbringen des Index in einer U-Röhre hat große Vorteile gegen *Wintersteins* Einrichtung. In der geraden Capillare des Mikrorespirationsapparates von *H. Winterstein* kommt es sehr leicht zum Platzen der Ränder der Indexflüssigkeit und dieselbe bleibt in kleinen Tröpfchen auf den Wänden der Capillare nach öfterer Verschiebung hängen. Man muß also den Index zeitweise „sammeln". Bei diesem Apparat fließen die Tröpfchen der Indexflüssigkeit, welche vielleicht bei der Verschiebung auf den Wänden hängen bleiben, automatisch in der Richtung zum Index herab. In dieser Weise bleibt also die Größe des Index konstant. Die Genauigkeit und die Geschwindigkeit der Ablesung von Druckdifferenzen sind größer. Endlich kann man diesen Apparat zur Analyse der Gase nicht nur der verschiedenen Gewebe, sondern auch der verschiedensten, wie Wasser-

so auch Landtiere benützen. Gegen den Apparat von *A. Neil Kensington* hat dieser besonders die Vorteile, daß hier die Hähne in Fortfall kommen und daß seine Empfindlichkeit durch die Neigung erhöht ist. Die Verbindung der Behälter mit den nach hinten abzweigenden Zweigröhren und die Endigung der Schenkel der Indexröhre ist viel zweckmäßiger eingerichtet. — Ich habe diesen Apparat zur Durchführung einer großen Reihe von Versuchen benützt, welche den Grad des respiratorischen Metabolismus bei unseren Süßwassertricladen in dem normalen und regenerierenden Stadium betreffen und habe mich von der Genauigkeit und Vorteilhaftigkeit, welche der gegenwärtige Apparat darbietet, überzeugt. Die Arbeit nähert sich ihrem Ende und wird an einer anderen Stelle veröffentlicht werden. Hier führe ich nur 2 Tabellen an, um die Empfindlichkeit des Apparates zu demonstrieren. Alle Erklärungen betreffs der Versuche findet der Leser in den Tabellen.

Schließlich mache ich den Leser auch auf den sehr einfachen, von *O. Warburg* konstruierten Apparat aufmerksam. Das Novum dieses Apparates liegt hauptsächlich in der genauen Art der Gasanalyse, uns dagegen handelt es sich eher um Verläßlichkeit in der Bestimmung von Volumveränderungen, um die Vereinfachung der Technik und die schnelle Durchführung des mikrorespirometrischen

Tabelle I.

Das Durchschnittsvolumen eines Teilstriches des Capillarschenkels der Quecksilberbürette: 1,318 cmm.

Zeit	Quecksilberbürette	Index	Temperatur	Wieviel Teilstriche der Skala kommen auf 1 Individium für eine Stunde	Das durch 1 Individium absorbierte O_2-Volum für 1 Stunde cmm	Der Durchschnittsverbrauch von O_2 für 1 Individuum u. 1 Std. aus dem ganz. Versuche genommen cmm	Bemerkungen
		74,1 rechts Grundstellung während des ganzen Versuches					Datum: 23. I. 22.
$11^h 28'$	22		im Aquarium 18,4	2,25	2,97		welche u. wieviel Individuen:
$11^h 36'$	25			2,19	2,89		*10* Individuen,
$11^h 45'$	28,3		im Laboratorium 18,3	1,91	2,52		normal, gut gefüttert, lange im
$12^h 6'$	35			1,62	2,14		Laboratorium gehalten.
$12^h 13'$	36,9		—	1,82	2,40	2,37	die Art: *Dendrocoelum lacteum*
$13^h 42'$	64	—	—	1,99	2,62		
14^h	70	—	—	1,51	1,99		
$14^h 13'$	73,3			1,58	2,08		
$14^h 30'$	77,8			1,65	2,17		in das Gefäß hineingelegt: $10^h 55'$
$14^h 38'$	80			1,71	2,25		der Apparat verschlossen $11^h 5'$
$14^h 52'$	84						

In den beiden Behältern war bei dem Versuche: 0,4 ccm 2% KOH. Das Verhalten der Würmer während des Versuches: Am Anfange des Versuches sind sie ruhig auf dem Boden herumgekrochen, dann sind sie in einen Klumpen zusammengekrochen. In beiden Behältern war nur wenig Wasser und zwar beiderseits eine genau abgemessene Menge.

Verfahrens. Es wäre vielleicht möglich, diese beiden Apparate zu kombinieren. Unser Apparat ist ebenfalls zur Messung der Assimilation und der Atmung der pflanzlichen Zellen und Organe geeignet.

Es obliegt mir noch an dieser Stelle, meinem Freund Dr. *Petřík*, Assistent des Physiologischen Institutes der medizinischen Fakultät an der Masaryk-Universität in Brno für seine kostbaren Ratschläge meinen wärmsten Dank auszusprechen. Die gläsernen Bestandteile des Apparates hat der hiesige Universitätsglasbläser *Josef Synek* verfertigt.

Tabelle II.

Das Durchschnittsvolumen eines Teilstriches des Capillarschenkels der Quecksilberbürette: 1,318 cmm.

Zeit	Quecksilberbürette	Index	Temperatur	Wieviel Teilstriche der Skala kommen auf 1 Individium für eine Stunde	Das durch 1 Individium absorbierte O_2-Volum für 1 Stunde cmm	Der Durchschnittsverbrauch von O_2 für 1 Individuum u. 1 Std. aus dem ganz. Versuche genommen cmm	Bemerkungen
$15^h 12'$	93	74 rechts Grundstellung während des ganzen Versuches	im Aquarium 19	—	—	0,99	
$15^h 25'$	97,2			0,97	1,28		Datum: 23. I. 22.
$15^h 40'$	101,6		im Laboratorium 19,8	0,88	1,16		welche u. wieviel Individuen:
$15^h 55'$	105			0,68	0,90		*20* Individuen,
$16^h 10'$	109		–	0,80	1,05		normal, gut gefüttert, lange im
$16^h 17'$	110,8		—	0,77	1,01		Laboratorium gehalten;
$18^h 7'$	137	–	im Aquarium 19,8	0,71	0,94		die Art:
$18^h 20'$	140		im Laboratorium 19,8	0,69	0,91		*Policelis nigra*
$18^h 25'$	141	–	–	0,60	0,79		
$18^h 38'$	144			0,69	0,91		
$18^h 50'$	147	–	—	0,75	0,99		
$19^h 1'$	150	—	—	0,82	1,08		in das Gefäß hineingelegt: $14^h 50'$
$19^h 11'$	153	–	–	0,90	1,19		der Apparat verschlossen $15^h 5'$

In den beiden Behältern war bei dem Versuche: 0,4 ccm 2% KOH. Die Würmer sind langsam während des ganzen Versuches auf dem Boden des Gefäßes gekrochen. In beiden Behältern war nur wenig Wasser und zwar beiderseits eine genau abgemessene Menge.

Literatur.

Bečka, Jan, Biologické Listy (Biologische Blätter) **7.** 1918/1919, Praha 1920. — *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden* Abt. 4, Teil 10, H. 1. Biologische Gasanalyse (*Müller-Krogh-Straub*). Urban & Schwarzenberg, Berlin-Wien 1920. — *Krogh, August,* Biochemische Zeitschrift, Berlin 1914. — *Neil-Kensington, Adam,* Biochem. Journ. **14.** 1920. — *Warburg, Otto,* Biochem. Zeitschr. Berlin 1919. — *Winterstein, Hans,* Biochem. Zeitschr., Berlin 1912. — *Winterstein, Hans,* Zeitschr. f. biol. Techn. u. Method., Leipzig 1913.

Über die Wirkung der Zuckerkonzentration auf die Glykogensynthese.

Von

Stefan Éderer.

(Aus dem Physiologischen Institut der ungarischen Universität zu Budapest.)

(Eingegangen am 20. März 1922.)

Die Frage des Regulationsmechanismus des konstanten Blutzuckerspiegels wird von verschiedenen Seiten in Angriff genommen. Die *Pflüger*sche Annahme dieser Regulation durch einen Nervenreiz wurde auf Grund gewisser experimenteller Erfahrungen in Frage gestellt. Wird nämlich bei Tieren das Großhirn ausgeschaltet [*Morita*[11])] oder das Rückenmark durchgeschnitten, werden die Nervi splanchnici oder die in der Leberpforte zur Leber ziehenden Nerven durchtrennt [*Freund*[7])], so ändert sich die Blutzuckerkonzentration nicht oder erreicht rasch ihre normale Höhe. Die Unabhängigkeit vom sympathischen Nervensystem zeigen die Versuche von *Miculicich*[19]) und *L. Pollak*[13]), die das sympathische Nervensystem durch Ergotoxin vom Erfolgsorgan abgeschaltet haben, ohne dabei Änderungen des Blutzuckerwertes zu beobachten. Nach *Mansfeld-Blum*[1]) verliert die Leber ihr Glykogen in Strychninkrämpfen auch dann, wenn sie vom Zentralnervensystem durch Nervendurchschneidung getrennt ist. Beim Phloridzindiabetes bleibt der Blutzuckerspiegel normal hoch auch dann, wenn das sympathische Nervensystem durch Ergotoxin gelähmt wird [*Pollak*[13])]. Nach Ergotoxinmengen, die hinreichen, um die Wirkung von 1 mg Adrenalin auf den Blutzuckerspiegel aufzuheben, bleiben die Zuckerwerte des Blutes unverändert.

Diese Ergebnisse stellen die Wirkung des Adrenalins als normalen hormoralen Reiz auch in Frage und lenken die Aufmerksamkeit auf die Blutzuckerkonzentration selbst, die den Regulationsapparat irgendwie in Tätigkeit setzt, um den Glykogenaufbau und -abbau in normalen Grenzen zu halten. *L. Pollak* formuliert diesen Satz so, daß das Nervensystem nicht zu den *obligaten* Bestandteilen der Regulation gehört.

Es entsteht nun die Frage, in welcher Weise die Blutzuckerkonzentration diese regulatorische Aufgabe erledigt. Bevor man sich aber

ein Bild über diese Verhältnisse im Organismus überhaupt vorstellt, und sich zu irgendeiner Annahme berechtigt fühlt, muß vorerst entschieden werden, welche Wirkung die Zuckerkonzentration direkt und unmittelbar auf den chemischen Ablauf des Glykogenverzuckerungs- und -speicherungsprozesses ausübt.

Diese Fragestellung veranlaßte mich zu den vorliegenden Versuchen, in denen die Wirkung der Zuckerkonzentration auf das System Glykogen-Zucker untersucht wurde.

Die Annahme, daß die Glykogensynthese eine reversible Reaktion darstellt, gründet sich auf Versuche, die speziell auf den Nachweis einer fermentativen Kohlenhydratsynthese gerichtet waren. Faßt man nun im System gelöstes Glykogen-Zucker, — der größte Teil des Glykogens ist in fester Form abgelagert, nimmt also an der Reaktion nicht teil —, die Konzentration dieser Stoffe als aktive Massen einer reversiblen Reaktion auf, so muß sich mit der Zeit ein Gleichgewicht einstellen. Dieser Gleichgewichtszustand ist nach den bisherigen Versuchen über fermentative Kohlenhydratsynthese ganz nahe zum Zustand der vollständigen Spaltung zu suchen. Es muß daher auch im Falle der angestrebten Glykogensynthese eine hohe Konzentration des Zuckers gewählt werden, um nachweisbare Mengen des synthetischen Polysaccharids erzeugen zu können.

So haben ja auch *Croft Hill*[4]), *E. Fischer*[6]), *Armstrong* in ihren klassischen Versuchen — in denen sie die Synthese von verschiedenen Biosen aus deren Spaltprodukten durch das entsprechende Spaltungsferment nachweisen konnten — mit 30—40 proz. Zuckerlösungen gearbeitet. *Cremer*[3]) sah im Hefepreßsaft die verschwundene Glykogenreaktion durch Zusatz von 30% Lävulose nach mehreren Tagen wieder auftreten. Auf die Reversibilität der Polysaccharidspaltung beziehen sich die Befunde *Scheridans*[14]), nach denen die Zersetzung der Stärke durch Diastase schneller vor sich geht, wenn die Reaktionsprodukte wegdialysiert werden. Daß ein durch den entstehenden Zucker beeinflußbarer Endzustand bei der diastatischen Hydrolyse der Stärke eintritt, erwähnen auch *Moritz* und *Glendenning*. Im Sinne der Reversibilität sprechen die Versuche von *Harden* und *Young*[8]), die im Hefepreßsaft durch Gärung ein synthetisches Polysaccharid aus Traubenzucker nachwiesen, das alle Eigenschaften des Glykogens aufwies.

Gemäß der Fragestellung wurden die Versuche so angestellt, daß vom Brei der Leber der verbluteten Hunde je ca. 10 g große Portionen ausgewogen und in Kolben verteilt wurden. Dieselben wurden dann mit der entsprechenden Glucoselösung beschickt und unter Toluol im Thermostat bei 38° bebrütet. Während des Versuches wurden die Kolben öfter geschüttelt, um eine dauernde Schichtung zu verhüten. Um Nebenwirkungen durch Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration zu vermeiden, wurde ein Phosphatgemisch nach *Henderson* als Puffermedium angewendet. Die Glucose wurde in dieser Lösung aufgelöst, eine weitere Portion der Phosphatlösung diente zur restlosen Übertragung des Leberbreies. Zur Bestimmung des Glykogens wurde

die Methodik von *Bierry*[2]) gebraucht. In die Kolben kam Kalilauge von einer Konzentration, die mit der darin befindlichen Flüssigkeitsmenge eben auf 35% verdünnt wurde. Nach ½stündigem Erhitzen bei 120° im Autoklav — Zerstörung der reduzierenden Stoffe außer Glykogen — wird abgekühlt, neutralisiert, mit Salzsäure von 1,18 spez. Gewicht angesäuert und auf 100 ccm aufgegossen. Die saure Hydrolyse des Glykogens vollzieht sich bei 120° im Autoklav binnen einer halben Stunde. Das Eiweiß wird mit *Patein*scher Lösung gefällt (10 g Leber verbrauchen ungefähr 100 ccm zur vollständigen Fällung). Das Quecksilber wird bei neutraler Reaktion mit Zinkstaub entfernt. Im klaren Filtrat geschah die Zuckerbestimmung nach *Bertrand* und zum Teil nach der Modifikation von *Möckl* und *Frank*. Da ich mit 10—80 proz. Zuckerlösungen arbeitete, wurde die *Bierry*sche Methodik auf Vollständigkeit der alkalischen Zerstörung des Zuckers kontrolliert. Es erwies sich bei hoher Konzentration eine Restreduktion, und diese bei jeder Versuchsreihe durch Kontrollbestimmungen festgestellte Menge — die einigen Milligramm Glucose entsprach — wurde von dem vom Glykogen stammenden Zucker in Abzug gebracht.

Die ersten Versuche wurden mit 10 proz. und 25 proz. Glucoselösung vollführt. Zu 2 Portionen von ca. 10 g Leberbrei kam je 10 g der Glucoselösung + 10 ccm *Henderson*sche Lösung. 2 andere Kolben wurden als Kontrolle ohne Zusatz von Zucker nur mit der Phosphatlösung auf dasselbe Volumen ergänzt. Nach 48stündiger Bebrütung Glykogenbestimmung. Der ursprüngliche Glykogengehalt der Leber wurde in 2 Parallelbestimmungen sofort festgestellt. Es stellte sich aber heraus, daß sämtliches Glykogen der Leber in 48 Stunden vollständig verschwunden ist.

Ich ging darum auf eine höhere Konzentration des Zuckers über. Durch Zusatz von 80 proz. Zuckerlösung zum Leberbrei konnte nur ein hemmender Einfluß des Zuckers auf den Glykogenabbau nachgewiesen werden. Nach 45stündiger Bebrütung nämlich war der Glykogengehalt noch nachweisbar, während in den Kontrollkolben ohne Zuckerzusatz alles Glykogen zersetzt war (Versuch 3).

Um die Geschwindigkeit des Prozesses zu beobachten, wurden in weiteren Versuchen einzelne Portionen in verschiedenen Zeiträumen verarbeitet. Die Hemmung des Glykogenabbaues kam in 24 Stunden deutlich zum Vorschein. Der ursprüngliche Glykogengehalt von 2,5% sank unter Zuckerzusatz auf 0,6%, während ohne Zuckerzusatz die Leber nur noch den dritten Teil dieser Menge enthielt. Noch nach 3 Tagen sind quantitativ nachweisbare Spuren von Glykogen zu finden. Ein Anwachsen des Glykogens aber als Zeichen einer Umkehrung der Reaktion in der Richtung der Synthese wurde vermißt (Versuch 4).

Um eine solche zu ermöglichen und die reversible Wirkung der Spaltprodukte zu vergrößern, war es angezeigt, den Glykogengehalt der Leber herabzudrücken. Zu diesem Zwecke wurde die Leber den Hunden nach 4—5 Hungertagen und täglichen Phloridzininjektionen (1 g in Öl) entnommen. Die Leber enthielt in einem Falle 0,18%, in einem anderen nur Spuren von Glykogen. Bei der angegebenen Versuchsanordnung war ein Glykogenansatz auch in diesen Fällen nicht nachweisbar (Versuch 5 u. 6).

Es tauchte nun die Frage auf, ob die Reaktion nicht reversibel verliefe, wenn das Glykogen nicht in die Reaktion eingreifen würde, da nach Ausschaltung der aktiven Masse des einen reagierenden Stoffes aus dem Reaktionssystem eine reversible Reaktion vollständig in einer Richtung verlaufen muß. Es müßte daher das Glykogen entweder fortwährend aus dem System entfernt werden oder, was die gleiche Wirkung hat, in einen reaktionsunfähigen Zustand übergeführt werden.

Nach Versuchen von *Kende*[9]) hemmen die Seifen den Glykogenabbau in hohem Maße. Schon 0,025 ccm einer $^{n}/_{100}$-Natriumoleinatlösung hemmt in Reagensglasversuchen den Abbau des Glykogens. Da die Seife den Abbau des Dextrins nicht hemmt, so schließt *Kende* eine Wirkung der Seife auf das Ferment aus. Die Diastase wird also nicht inaktiviert, nur die entstandene Glykogen-Seifenverbindung kann sie nicht angreifen. In dieser Form ist das Glykogen von unserem Standpunkt reaktionsunfähig, da der Kontakt mit dem Ferment ausgeschaltet ist.

Die Anordnung wurde so gestaltet, daß der Leberbrei mit 10 ccm einer wie vorher zubereiteten 10 proz. Glucoselösung versetzt wurde und als Verdünnungsflüssigkeit 10 ccm einer Natriumoleinatlösung (1 proz.) — mit der Hendersonlösung zubereitet — verwendet wurde. Im Vergleich zu dem durch die vorangehenden Versuche bewiesenen, spontanen, rapiden Glykogenschwund, hemmte die Seife den Abbau bedeutend. Der ursprüngliche Glykogengehalt von 1,87% sank nach 68 Stunden auf 1,14% und nach 6 Tagen auf 1,09%. Eine Synthese von Glykogen blieb aber aus (Versuch 8).

Ein weiterer Versuch wurde angeschlossen zur Prüfung einer evtl. vorhandenen synthetischen Wirkung einer Diastaselösung. Die Kolben wurden mit den folgenden Flüssigkeiten beschickt: 10 ccm 10 proz. Glucoselösung + 5 ccm 1 proz. Diastaselösung + 5 ccm 1 proz. Natriumoleinat. Sie wurden dann eine Woche lang im Thermostaten stehengelassen, danach wie oben auf Glykogen untersucht. Die Befunde waren in allen Kolben negativ. Eine synthetische Wirkung der Diastase wurde nicht gefunden.

Als Resultat dieser Versuche kann also festgestellt werden, daß in vitro im Reaktionssystem Glykogen-Glucose die Umkehrung des

Reaktionsverlaufes in synthetischer Richtung weder durch die Erhöhung der Glucose- bzw. Verminderung der Glykogenkonzentration, noch durch Festlegung des Glykogens in einer reaktionsunfähigen Form nachgewiesen werden konnte.

Dieses Ergebnis gestattet daher die Folgerung, daß ein regulierender Einfluß der Blutzuckerkonzentration auf den Blutzuckerspiegel nicht als Funktion einer aktiven Masse im Sinne der chemischen Dynamik aufgefaßt werden kann. Das Massenwirkungsgesetz ist zur Erklärung dieses Regulationsmechanismus wenigstens nicht genügend.

Tabelle I.

Versuchs-Nr.	Versuchsdauer	*Ursprünglicher* Glykogengehalt der Leber als Glucose berechnet			Glykogengehalt nach dem Versuch *unter* Zuckerzusatz			Glykogengehalt der Leber nach dem Versuch *ohne* Zuckerzusatz		
		Leber g	Glucose mg	%	Leber g	Glucose mg	%	Leber g	Glucose mg	%
III.	45 Stdn.	12,20	495,4	4,06	9,3	Spuren	—	11,19	θ	θ
		10,26	404,1	3,93	10,78	1,35	0,01	11,78	θ	θ
IV.	24 Stdn.	9,64	233,25	2,42	10,25	53,3	0,52	9,02	23,25	0,26
		11,07	272,7	2,50	9,16	62,1	0,67	9,36	17,78	0,19
	3×24 Stdn.	—	—	—	10,48	Spuren	—	10,05	θ	θ
		—	—	—	9,56	„	—	9,48	θ	θ
V.	3 Tage	9,38	14,25	0,15	12,07	„	θ	12,9	θ	θ
		7,59	15,90	0,21	11,51	θ	-	9,64	θ	θ
VI.	3 Tage	9,18	Spuren	—	10,32	θ	—	—	—	—
		10,36	„	—	11,44	θ	—	—	—	—
VIII.	68 Stdn.	9,64	182,8	1,89	9,84	107,25	1,09	—	—	—
		10,93	202,2	1,85	9,34	109,2	1,19	—	—	—
	6 Tage	—	—	—	10,32	116,6	1,13	—	—	—
		—	—	—	9,58	101,5	1,06	—	—	—

Literatur.

[1]) *Blum, P. Mansfeld,* Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **161**, 516. 1915. — [2]) *Bierry, H.* und *E. Z. Grurewska,* Cpt. rend. **155** (IV), 1557. 1912. — [3]) *Cremer,* B. **32**, 2062. 1899. — [4]) *Croft Hill,* Journ. of the chem. soc. **73**, 634. 1898. — [5]) *Emmerling,* B. **34**, 600 u. 2207. 1901. — [6]) *Fischer, E., Armstrong,* B. **32**, 2062. 1899. — [7]) *Freund,* Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **78**, 188. 1915. — [8]) *Harden* und *Young,* Biochem. Journ. **13**, 630. 1913. — [9]) *Kende,* Biochem. Zeitschr. **82**, 9. 1917. — [10]) *Miculizich,* Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **69**, 133. 1912. — [11]) *Morita,* Ebenda **78**, 188. 1915. — [12]) *Pflüger,* Das Glykogen, 2. Aufl. 1905. — [13]) *Pollak, L.,* Med. Klin. **31**, 935. 1921. — [14]) *Scheridan,* Journ. of physiol. **11**, 226. 1890.

Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung einiger Saponine auf rote Blutkörperchen und Trypanosomen.

Von

Yoshitsune Wada.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 23. März 1922.)

Die mit dem Namen Saponine belegten Pflanzenstoffe wirken auf rote Blutkörperchen in quantitativer Hinsicht sehr verschieden. Wir kennen Saponine, die noch in einer Verdünnung 1 : 1 000 000 und darüber hinaus hämolytisch wirken, während andere bereits bei einer Verdünnung 1: 10 000 eine hämolytische Wirkung vermissen lassen. Bezüglich der Wirkung der Saponine auf tierische Mikroorganismen speziell auf Protozoen finden sich in der Literatur keine Angaben über die Wirkungsstärke der verschiedenen Saponine. *Levaditi* und *Rosenbaum*[1]) geben an, daß Paramäcien bei einer Saponinkonzentration von 1: 10 000 ihre Bewegungen sofort einstellen und abgetötet werden. Entsprechend dem Verhalten des Cholesterins in bezug auf die hämolytische Wirkung fanden sie weiter, daß auch hier das Cholesterin die Wirkung auf die Paramäcien aufhebt. Über die Herkunft des zu den Versuchen benutzten Saponins machen die Autoren keine Angaben.

Es ist mir die Aufgabe gestellt worden, das hämolytische Vermögen einiger Saponine *mit der Wirkung* auf Trypanosomen zu vergleichen. Zu den Versuchen wurden 3 verschiedene Saponine der Sammlung des Instituts benutzt und zwar Saponin, Cyclamin und Solanin. Herr Professor *Sieburg* hatte die Freundlichkeit, uns noch ein Saponin aus Guajacrinde und ein anderes aus Roßkastanie zur Verfügung zu stellen. Zur Feststellung der Konzentrationen, die Hämolyse hervorrufen, benutzte ich eine 5proz. serumfreie Kaninchenblutkörperchenaufschwemmung. Die Resultate wurden nach 2 Stunden (37°) abgelesen. Wie aus den nachstehenden Tabellen I—V hervorgeht, liegt die hämolytische Grenzkonzentration für:

Cyclamin bei 1 : 1 500 000 (Tabelle I),
Solanin bei 1 : 937 500 (Tabelle II),
Saponin bei 1 : 200 000 (Tabelle III),
Saponin aus Guajacrinde 1 : 40 000 (Tabelle IV),
Saponin aus Roßkastanie 1 : 25 000 (Tabelle V).

---

[1]) Ann. de l'inst. Pasteur **22**, 223.

Tabelle I.

Nr.	Cyclamin 1:400000	Physiol. NaCl-Lösung	Kaninchenblutkörperchen 5%	Cyclaminverdünnung berechnet	Nach 2 Stund. bei 37°
1	1,0	—	0,5	1:600000	+++
2	0,8	0,2	0,5	1:750000	+++
3	0,6	0,4	0,5	1:1000000	+++
4	0,4	0,6	0,5	1:1500000	++
5	0,2	0,8	0,5	1:3000000	—
6	Kontrolle	1,0	0,5	—	—

Tabelle II.

Nr.	Solanin 1:500000	Physiol. NaCl-Lösung	Kaninchenblutkörperchen 5%	Solanin-Verdünnung berechnet	Nach 2 Stund. bei 37°
1	1,0	—	0,5	1:750000	++
2	0,8	0,2	0,5	1:937500	—
3	0,6	0,4	0,5	1:1250000	—
4	0,4	0,6	0,5	1:1875000	—
5	0,2	0,8	0,5	1:3750000	—
6	Kontrolle	1,0	0,5	—	—

Tabelle III.

Nr.	Saponin 1:10000	Physiol. NaCl-Lösung	Kaninchenblutkörperchen 5%	Saponin-Verdünnung berechnet	Nach 2 Stund. bei 37°
1	0,4	0,6	0,5	1:37500	++
2	0,3	0,7	0,5	1:50000	++
3	0,2	0,8	0,5	1:75000	++
	1:80000				
4	1,0	—	0,5	1:120000	+
5	0,8	0,2	0,5	1:150000	+
6	0,6	0,4	0,5	1:200000	+
7	0,5	0,5	0,5	1:240000	—
8	0,4	0,6	0,5	1:300000	—
9	0,2	0,8	0,5	1:600000	—
10	Kontrolle	1,0	0,5	—	—

Tabelle IV.

Nr.	Saponin aus Guajacrinde 1:8000	Physiol. NaCl-Lösung	Kaninchenblutkörperchen 5%	Saponin-Verdünnung berechnet	Nach 2 Stund. bei 37°
1	1,0	—	0,5	1:12000	++
2	0,5	0,5	0,5	1:24000	++
	1:16000				
3	0,8	0,2	0,5	1:30000	+
4	0,6	0,4	0,5	1:40000	+
5	0,4	0,6	0,5	1:60000	—
6	0,2	0,8	0,5	1:120000	—
7	Kontrolle	1,0	0,5	—	—

Tabelle V.

Nr.	Saponin aus Roßkastanie 1:10000	Physiol. NaCl-Lösung	Kaninchenblutkörperchen 5%	Saponin-Verdünnung berechnet	Nach 2 Stund. bei 37°
1	1,0	—	0,5	1:15000	+ + +
2	0,8	0,2	0,5	1:18750	+ +
3	0,6	0,4	0,5	1:25000	+
4	0,4	0,6	0,5	1:37500	—
5	0,2	0,8	0,5	1:75000	—
6	0,1	0,9	0,5	1:15000	—
7	Kontrolle	1,0	0,5	—	—

Die Tabellen zeigen, daß Cyclamin am stärksten hämolytisch wirkt. Die hämolytische Wirkung nimmt in der Reihenfolge Cyclamin, Solanin, Saponin, Saponin aus Guajacrinde und Saponin aus Roßkastanie ab.

Für die Prüfung der Wirkung auf Trypanosomen wählte ich einen Stamm von Trypanosoma equiperdum, dem Erreger der Dourine[1]). Weiße Mäuse wurden intraperitoneal damit infiziert und zeigten etwa am 3. oder 4. Tage zahlreiche Trypanosomen im peripheren Blute. In diesem Stadium wurden sie aus der Carotis entblutet und das Blut in 0,85 proz. Kochsalzlösung mit einem Zusatz von 1,5% Natriumcitrat aufgefangen. 0,1 ccm dieser Aufschwemmung wurde in 1,0 ccm Saponinlösung gebracht und nach 30 Minuten (Zimmertemperatur) das Verhalten der Trypanosomen im ungefärbten und mit *Manson*scher Methylenblaulösung gefärbten Präparat geprüft. Die verwendete Aufschwemmung zeigte bei einer 940fachen Vergrößerung (Okular 4, $^1/_{12}$ Ölimmersion Zeiss) im Gesichtsfeld etwa 5—6 Trypanosomen. Gleichzeitig wurden die verschiedenen Saponinverdünnungen gesunden Mäusen intraperitoneal injiziert. Die infizierten Mäuse wurden bis zum 13. Tage beobachtet und ihr Blut täglich auf Trypanosomen untersucht. Die mit Saponin versetzte Trypanosomenaufschwemmung zeigte bei einer wirksamen Konzentration eine Aufquellung der Trypanosomenleiber, sie erschienen auch zuweilen als ob sie zusammengerollt waren. Man sah auch Trypanosomen, deren Kopf- oder Schwanzteil fehlte. Aus den Tabellen VI—X gehen die Grenzwerte der Saponinverdünnungen hervor, die innerhalb 30 Minuten bei Zimmertemperatur die Trypanosomen abtöten. Die Konzentrationen betragen für:

Solanin 1 : 550 000 (Tabelle VI),
Cyclamin 1 : 55 000 (Tabelle VII),
Saponin 1 : 13 750 (Tabelle VIII),
Saponin aus Roßkastanie 1 : 11 000 (Tabelle IX),
Saponin aus Guajacrinde 1 : 1 375 (Tabelle X).

---

[1]) Den Stamm verdankt das Institut Herrn Geheimrat *Haendel*, dem wir auch an dieser Stelle für seine Freundlichkeit bestens danken möchten.

Tabelle XI.

Nr.	Solanin 1:500000	Physiol. Kochsalzlösung	Mausblut mit Trypanosomen	Solaninverdünnung berechnet	Nach 30 Minuten Beweglichk.	Nach 30 Minuten Impfversuch
1.	1,0	—	0,1	**1:550000**	—	bis zum 13. Tag —
2.	0,9	0,1	0,1	1:611110	—	am 8. Tage +
3.	0,8	0,2	0,1	1:687500	+	„ 9. „ +
4.	0,6	0,4	0,1	1:916660	+ +	„ 8. „ +
5.	Kontrolle	1,0	0,1	—	+ +	„ 5. „ +

Tabelle XII.

Nr.	Cyclamin 1:10000	Physiol. Kochsalzlösung	Mausblut mit Trypanosomen	Cyclaminverdünnung berechnet	Nach 30 Minuten Beweglichk.	Nach 30 Minuten Impfversuch
1.	0,4	0,6	0,1	1:27500	—	bis zum 13. Tag —
2.	0,3	0,7	0,1	1:36660	aufgequoll.	„ „ 10. „ —
3.	0,2	0,8	0,1	**1:55000**	—	„ „ 13. „ —
4.	0,1	0,9	0,1	1:110000	+	am 8. Tage +
5.	Kontrolle	1,0	0,1	—	+ +	„ 2. „ +

Tabelle VIII.

Nr.	Saponin 1:10000	Physiol. Kochsalzlösung	Mausblut mit Trypanosomen	Saponinverdünnung berechnet	Nach 30 Minuten Beweglichk.	Nach 30 Minuten Impfversuch
1.	1,0	—	0,1	1:11000	—	bis zum 13. Tag —
2.	0,9	0,1	0,1	1:12220	aufgequoll.	„ „ 10. „ —
3.	0,8	0,2	0,1	**1:13750**	—	„ „ 13. „ —
4.	0,7	0,3	0,1	1:15710	—	am 5. Tage +
5.	0,6	0,4	0,1	1:18330	sehr träge	„ 3. „ +
6.	0,4	0,6	0,1	1:27500	„	„ 6. „ +
7.	0,2	0,8	0,1	1:55000	+ +	„ 4. „ +
8.	Kontrolle	1,0	0,1	—	+ + +	„ 4. „ +

Tabelle IX.

Nr.	Saponin aus Roßkastanie 1:10000	Physiol. Kochsalzlösung	Mausblut mit Trypanosomen	Saponinverdünnung berechnet	Nach 30 Minuten Beweglichkeit	Nach 30 Minuten Impfversuch
1.	1,0	—	0,1	**1:11000**	aufgequollen	bis zum 11. Tag —
2.	0,9	0,1	0,1	1:12220	„	am 8. Tage +
3.	0,8	0,2	0,1	1:13750	„	„ 3. „ +
4.	0,7	0,3	0,1	1:15710	„	„ 3. „ +
5.	Kontrolle	1,0	0,1	—	+	„ 3. „ +

Tabelle X.

Nr.	Saponin aus Guajacrinde 1:1000	Physiol. Kochsalzlösung	Mausblut mit Trypanosomen	Saponinverdünnung berechnet	Nach 30 Minuten Beweglichkeit	Nach 30 Minuten Impfversuch
1.	1,0	—	0,1	1:1100	—	bis zum 13. Tag —
2.	0,8	0,2	0,1	**1:1375**	—	„ „ 10. „ —
3.	0,7	0,3	0,1	1:1571	aufgequollen	am 4. Tage +
4.	0,6	0,4	0,1	1:1833	„	„ 4. „ +
5.	0,5	0,5	0,1	1:2200	sehr träge	„ 2. „ +
6.	0,4	0,6	0,1	1:2750	+ +	„ 2. „ +
7.	0,2	0,8	0,1	1:5500	+ +	„ 6. „ +
8.	Kontrolle	1,0	0,1	—	+ +	„ 2. „ +

Diese Resultate zeigen, daß im allgemeinen die Wirkung auf Trypanosomen und auf rote Blutkörperchen bei den geprüften Saponinen parallel gehen. Auch hier ist die Wirkung am stärksten bei denjenigen Saponinen, deren hämolytischer Grenzwert größer ist als 1:10 000. Freilich stimmt die für die Wirkung auf Trypanosomen ermittelte Reihe nicht vollständig mit der für die hämolytische Wirkung oben angegebenen überein. Während z. B. Cyclamin stärker hämolytisch wirkt als Solanin, sehen wir hier, daß die Trypanosomen abtötende Konzentration 10 mal geringer ist als die hämolytische Grenzkonzentration. Für Saponin aus Guajacrinde und aus Roßkastanie gilt dasselbe.

Die Versuche haben uns also zu dem Resultat geführt, daß die stark hämolytisch wirkenden Saponine auch eine starke Wirkung auf Trypanosomen zeigen. Es bestehen aber offenbar noch feinere Unterschiede und man ist nicht berechtigt, aus der für die hämolytische Wirkung ermittelten Grenzkonzentration auf die für die Trypanosomen wirksame zu schließen.

Über die Wirkung der Wasserzufuhr auf den Gehalt des Blutes und des Harns an reduzierenden Stoffen.

Von

A. Norgaard.

(Aus dem Medizin.-chemischen Institut der Universität Lund, Schweden.)

(Eingegangen am 25. März 1922.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Das Aufkommen der Mikromethoden zur chemischen Bestimmung in Blut und Harn veranlaßte zahlreiche Untersuchungen über die Blutzuckersteigerung nach Eingabe von Kohlenhydraten; dagegen hat die Eingabe von Wasser und dessen Einfluß auf die Mengen von reduzierenden Stoffen im Blute und Harn nur spärlich und meist nur vorübergehend Besprechung gefunden. Gegenwärtige Arbeit will untersuchen, welchen Einfluß die Wasserzufuhr auf das Reduktionsvermögen des Blutes und des Harns ausübt.

Die Versuchsanordnung war die folgende: Die Versuchsperson (normal, 37jährig, A. N.) begann den Versuch nüchtern, letzte Mahlzeit 11—18 Stunden vor dem Anfang des Versuches. Der Harn wurde mit $^1/_4$ stündigen Zwischenräumen quittiert. Wenn die Harnportionen einigermaßen dieselbe Größe hatten, wurde im Laufe von einigen Minuten 1 Liter lauwarmes Wasser getrunken, was 18 ccm pro Kilogramm entspricht. Nach etwa $^3/_4$ Stunden steigerte sich die Diurese, und wenn diese wieder abgenommen hatte, wurde der Versuch abgeschlossen. Während der ganzen Versuchsperiode wurden Blutproben zur Reduktionsbestimmung entnommen, in einigen Fällen zugleich zur Hämoglobinmessung.

Im Blute wurde die Reduktion nach der letzten von *Ivar Bang* veröffentlichten Methode bestimmt, die in 3 von den Versuchen durch gleichzeitige und übereinstimmende Proben nach *Hagedorns* Methode kontrolliert wurde. Das Hämoglobin wurde mit *Autenrieths* Hämoglobinometer (standardisiert) gemessen.

Im Harn wurde das Reduktionsvermögen gleichfalls nach *Bangs* Methode bestimmt; zugleich wurde die Diurese gemessen.

In einigen der Versuche wurde der Blutzuckerspiegel in der Weise gehoben, daß die Versuchsperson in Versuch 5 jede 5. Minute etwa 5 g Stärke (1 Cakes) und in Versuch 6 und 7 etwa 3 g Rohrzucker verzehrte.

Die Versuchsresultate erhellen aus den Tabellen I—VII.

Es wurde also bei der Bestimmung in Blut und Harn in derselben Weise verfahren; während aber das Reduktionsvermögen des Blutes weit zum größten Teil von der Glucose herrührt, so daß man praktisch gesprochen die Menge von reduzierenden Stoffen im Blute der Glucose gleichsetzen kann, ist das Verhältnis bei dem Harn ein anderes. Zwar ist ein nicht geringer Teil der reduzierenden Stoffe hier Glucose, die Restreduktion ist hier aber, wie die Vergärungsversuche ergaben, viel größer als die des Blutes.

In den Tabellen ist vergleichshalber die Menge von reduzierenden Stoffen daher nicht als Glucose berechnet worden, sondern einfach durch die verbrauchte Menge $^{n}/_{200}$-Thiosulfatlösung in Kubikzentimeter pro 0,1 ccm Harn bzw. Blut bezeichnet. Der Blutzuckerwert ist zugleich in der gewöhnlich benutzten Einheit, nämlich in Prozent pro Gewichtseinheit Blut, angegeben.

Die Kolumne, welche die absolute mit dem Harn sezernierte Menge von reduzierenden Stoffen enthält, gibt an, wieviele Kubikzentimeter $^{n}/_{200}$-Thiosulfat gebraucht werden müßten, um die ganze in der Zeiteinheit ($^{1}/_{4}$ Stunde) sezernierte Harnmenge zu titrieren.

I. Der Einfluß des Wassers auf das Reduktionsvermögen des Blutes.

In den 4 Versuchen, in denen das Reduktionsvermögen des Blutes und somit der Blutzucker normal waren, trat 2 mal (Versuch 3 und 4) eine geringe Senkung des Blutzuckerspiegels ein. In Versuch 1 und 2 war diese Senkung eine ganz unbedeutende, allenfalls innerhalb des Versuchsfehlers liegende. Um zu untersuchen, ob diese Senkung von einer Verdünnung des Blutes herrührte, wurde in einigen Versuchen das Hämoglobin gemessen, und es zeigte sich, daß allerdings ein Hämoglobinabfall eintrat (höchstens von 4—5%), daß derselbe aber nicht mit der Abnahme des Reduktionsvermögens zusammenfiel. Es liegt daher Grund vor, anzunehmen, daß das Verhältnis ein komplizierteres ist.

Um zu untersuchen wie die Wasserzufuhr auf einen künstlich vermehrten Blutzucker wirkte, wurden die Versuche 5—7 angestellt, in denen eine mit kurzen konstanten Zwischenräumen stattfindende gleichzeitige Zufuhr von kleinen Mengen von Kohlenhydraten das Reduktionsvermögen des Blutes steigerte. In diesen 3 Versuchen zeigte sich eine bedeutende Abnahme des Reduktionsvermögens des Blutes.

II. Der Einfluß der Wasserzufuhr auf den Harn.

1. *Einfluß auf die Diurese.* Im Laufe von 1—2 Viertelstunden beginnt die Diurese zu steigen, nimmt aber erst nach etwa $^{3}/_{4}$ Stunden in bedeutendem Grade zu. Die Größe der Diurese war abhängig von dem Flüssigkeitsverbrauch des vorhergehenden Tages und dem Zeitpunkt der letzten Mahlzeit.

2. ***Einfluß auf die Konzentration der reduzierenden Stoffe im Harn.*** Bei der untersuchten Person waren die Thiosulfatmengen in den ersten Proben vor der Vermehrung der Diurese $1^1/_2$—5 mal so groß wie die entsprechenden im Blute, als die Diurese aber ihren Gipfel erreichte, sank das Reduktionsvermögen des Harns auf $^1/_9$—$^1/_4$ von dem des Blutes. Da nun der größte Teil vom Reduktionsvermögen des Blutes von der Glucose herrührt, aber nur ein geringerer Teil vom Reduktionsvermögen des Harns von diesem Stoff stammt, darf man annehmen, daß der von mehreren Seiten hervorgehobene Zusammenhang zwischen Blutzucker und Harnzucker bei Karenz im höchsten Grade labil ist und sich durch die hervorgerufene

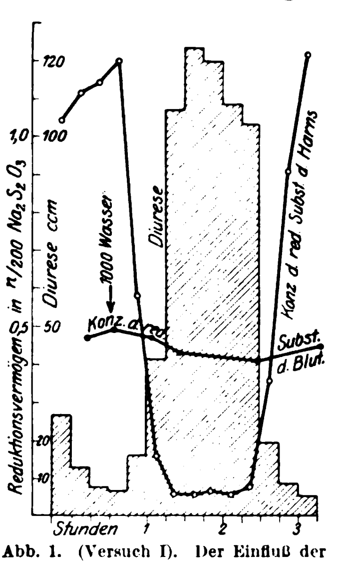


Abb. 1. (Versuch I). Der Einfluß der Wasserzufuhr auf das Blut und auf den Harn.

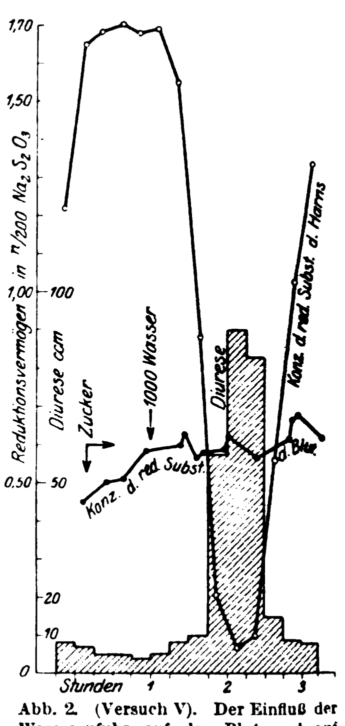


Abb. 2. (Versuch V). Der Einfluß der Wasserzufuhr auf das Blut und auf den Harn.

Wasserdiurese verschieben läßt. Die Glucose ist daher nicht zu der Gruppe von Stoffen zu rechnen, die, wie z. B. Aceton, in der Blutkonzentration ausgeschieden werden, und daher in absolutem Maß der Diurese proportional.

3. Betrachtet man den *Einfluß der Wassereingabe auf die Menge der in der Zeiteinheit ausgeschiedenen reduzierenden Stoffe* (in Thiosulfat angegeben), so zeigt es sich, daß die Diurese diese Ausscheidung nicht merkbar beeinflußt. In der Zeiteinheit wird, praktisch gesprochen, unabhängig von der Konzentration gleichviel ausgeschieden. Dies deutet darauf, daß die Glucoseausscheidung das Ergebnis einer Sekretion und nicht das Ergebnis einer kombinierten Filtration und einer Wasser-

resorption ist. Man kann jedenfalls den Satz aufstellen, daß die Konzentration der reduzierenden Stoffe sowohl bei Karenz als bei Wasserzufuhr der Größe der Diurese in der Zeiteinheit umgekehrt proportional ist. Daraus folgt wiederum eine Bestätigung des für die Klinik wichtigen Satzes, daß eine Konzentration des Harns, z. B. infolge einer aufgehobenen Wasserzufuhr, eine so hochgradige relative Steigerung der Konzentration der reduzierenden Stoffe im Harn bewirken kann, daß sich mit unseren gewöhnlichen Reagenzien (Almen, Barreswille) ein positiver Ausschlag ergeben kann, und daß das paradoxale Verhältnis eintreten kann — wie in Versuch 7 —, daß bei einem Blutzuckergehalt von 0,075 eine schwache, aber sicherlich positive Almenreaktion, bei einem Blutzuckergehalt von 0,11—0,13 aber ein negatives Resultat vorliegt.

Will man dies verhüten, so besteht das einfache Mittel in einer Verdünnung des Harns in einem solchen Verhältnis, daß die ausgeschiedene Harnmenge einer Diurese von 1 ccm pro Minute entspricht.

III.

Betrachten wir schließlich *das Verhältnis zwischen den absoluten ausgeschiedenen Mengen von reduzierenden Stoffen im Harn und der Konzentration des Blutes an diesen Stoffen*, so erhalten wir durch die folgende Tabelle eine Übersicht darüber.

Versuch	V	IV	VI	I	II	III
Blutzucker . .	0,101	0,090	0,090	0,078	0,077	0,072
Blut	0,594	0,529	0,529	0,459	0,453	0,423
Harn	106,8	94,1	88,8	76,6	79,7	67,5

Die oberste Reihe der Tabelle enthält die Versuchsnummern, die zweite Reihe den in der gewöhnlichen Weise berechneten Blutzucker, die dritte die entsprechende Thiosulfatzahl, volumetrisch berechnet, und die letzte Reihe die per Zeiteinheit durchschnittliche ausgeschiedene Menge von reduzierenden Stoffen, in benutztem Thiosulfat (volumetrisch) ausgedrückt. Es wurde in allen Fällen eine Periode gebraucht von dem Augenblick, wo das Wasser getrunken wurde, bis zum Schluß des Versuches. Der durchschnittliche gravimetrische Blutzuckerwert und der entsprechende volumetrische Thiosulfatwert wurde in der Weise ermittelt, daß man ein Rechteck herstellte mit derselben Grundlinie, wie der genannte Teil der Versuchsperiode, und von demselben Flächeninhalt wie der von der Blutzuckerkurve begrenzte. Die Höhe dieses Rechtecks wurde als durchschnittlicher Wert benutzt.

Man sieht, daß in gewissem Maße Übereinstimmung besteht zwischen dem Reduktionsvermögen des Blutes und der absoluten Menge der ausgeschiedenen reduzierenden Stoffe; letztere sind am reichlichsten vorhanden, wo das Reduktionsvermögen des Blutes groß ist. Direkte Proportionalität liegt nicht vor, was auch nicht zu erwarten war, da die Restreduktion im Harn sich geltend macht.

Versuch I.

Zeit	Harnmenge	Verbrauchte ccm $n/_{200}$-$Na_2S_2O_3$ pro 0,1 ccm Harn	Total	Zeit	$n/_{200}$-$Na_2S_2O_3$ (Blut)	% Blutzucker
10^h	27	1,04	281	10^h 14′	0,469	0,080
10^h 15′	13	1,11	144		—	—
10^h 30′	8	1,14	91	10^h 36′	0,494	0,084
Wasser						
10^h 45′	7	1,20	84	—		—
11^h	16	0,58	93	11^h 05′	0,474	0,081
11^h 15′	42	0,16	67	11^h 25′	0,432	0,074
11^h 30′	108	0,06	65	—	—	—
11^h 45′	124	0,06	74	—	—	—
12^h	120	0,07	84		—	—
12^h 15′	109	0,06	65	—	—	—
12^h 30′	103	0,08	82	12^h 28′	0,416	0,071
12^h 45′	20	0,36	72	—	—	—
1^h	9	0,91	82	—	-	—
1^h 15′	6	1,22	73	1^h 18′	0,450	0,077

Nüchtern. Der Harn jede Viertelstunde quittiert. Von 10^h 31′ bis 10^h 34′ wird ein Liter lauwarmes Wasser getrunken.

Versuch II.

Zeit	Harnmenge	Verbrauchte ccm $n/_{200}$-$Na_2S_2O_3$ pro 0,1 ccm Harn	Total	Zeit	$n/_{200}$-$Na_2S_2O_3$ (Blut)	% Blutzucker
10^h 30′	10,5	0,68	71	—	—	—
10^h 45′	20	0,87	174	10^h 53′	0,427	0,073
11^h	7	1,01	71	10^h 59′	0,424	0,072
Wasser						
11^h 15′	6	1,35	81	11^h 13′	0,443	0,076
11^h 30′	7	1,22	85	11^h 27′	0,428	0,073
11^h 45′	19	0,51	97	11^h 38′	0,401	0,068
12^h	48	0,15	72	11^h 41′	0,398	0,068
12^h 15′	106	0,07	74	12^h 04′	0,384	0,066
12^h 30′	130	0,06	78	—	—	—
12^h 45′	116	0,07	81	12^h 42′	0,423	0,072
1^h	84	0,10	84	1^h 01′	0,465	0,079
1^h 15′	12	0,53	64	1^h 28′	0,515	0,088
1^h 30′	7	1,18	83	1^h 31′	0,488	0,083
1^h 45′	5	1,55	78	-	—	--

Dieselbe Versuchsanordnung. Das Wasser wurde von 11^h 03′ bis 11^h 06′ getrunken.

Versuch III.

Zeit	Harnmenge	Verbrauchte ccm $n/_{100}$-$Na_2S_2O_3$ pro 0,1 ccm Harn	Total	Zeit	$n/_{100}$-$Na_2S_2O_3$ (Blut)	% Blutzucker	Hämoglobin
10h 30′	11	0,74	81	10h 43′	0,412	0,070	—
10h 45′	25	0,80	200	—	—	—	—
11h	5,5	1,20	66	11h 10′	—	—	104
11h 15′	5	1,24	62	11h 12′	0,423	0,072	—
Wasser							
11h 30′	4,5	1,21	55	11h 41′	—	—	96
11h 45′	10,5	1,05	110	11h 46′	0,426	0,073	—
12h	13	0,57	74	12h 04′	—	—	103
—	—	—	—	12h 07′	0,428	0,073	—
12h 15′	45	0,12	54	12h 28′	—	—	96
12h 30′	110	0,06	66	12h 31′	0,420	0,072	—
12h 45′	106	0,06	64	12h 50′	—	—	99
1h	102	0,06	61	12h 51′	0,441	0,075	—
1h 15′	108	0,07	76	1h 10′	—	—	99
—	—	—	—	1h 12′	0,429	0,073	—
1h 30′	64	0,11	70	1h 14′	0,473	0,081	—
1h 45′	30	0,23	69	1h 35′	—	—	103
2h	10	0,53	53	1h 37′	0,441	0,075	—
2h 15′	8,5	0,70	60	2h 05′	—	—	100
2h 30′	7	0,94	66	2h 07′	0,466	0,080	—
—	—	—	—	2h 12′	0,462	0,079	—

Dieselbe Versuchsanordnung. Das Wasser wurde von 11h 18′ bis 11h 20′ getrunken. Außerdem wurde Hämoglobin gemessen.

Versuch IV.

Zeit	Harnmenge	Verbrauchte ccm $n/_{100}$ $Na_2S_2O_3$ pro 0,1 ccm Harn	Total	Zeit	$n/_{100}$-$Na_2S_2O_3$ (Blut)	%-Blutzucker
10h 30′	21	1,28	269	—	—	—
10h 45′	4	1,60	64	—	—	—
11h	4	1,65	66	11h 23′	0,490	0,084
11h 15′	5,5	1,94	107	11h 25′	0,508	0,087
11h 30′	5	1,48	74	11h 27′	0,478	0,082
Wasser						
11h 45′	7	1,45	102	11h 57′	0,499	0,085
12h	3,5	1,46	51	11h 59′	0,561	0,096
12h 15′	16,5	0,97	160	—	—	—
12h 30′	38	0,32	122	12h 41′	0,520	0,089
12h 45′	68	0,14	95	12h 43′	0,511	0,087
1h	43	0,20	86	12h 46′	0,536	0,092
1h 15′	26	0,34	88	1h 21′	0,525	0,090
1h 30′	8,5	0,72	61	1h 23′	0,536	0,092
1h 45′	7	1,45	102	2h 05′	0,489	0,084
2h	6	1,28	77	2h 07′	0,520	0,089

Nüchtern 18 Stunden. Das Wasser wurde von 11h 35′ bis 11h 40′ getrunken.

Versuch V.

Zeit	Harnmenge	Verbrauchte ccm n/200-$Na_2S_2O_3$ pro 0,1 ccm Harn	Total	Zeit	n/200-$Na_2S_2O_3$ (Blut)	% Blutzucker
11h	8	1,22	98	11h 06′	0,450	0,077
Cakes						
11h 15′	7	1,65	115	11h 23′	0,500	0,085
11h 30′	5	1,68	84	11h 38′	0,513	0,088
11h 45′	5	1,70	85	11h 56′	0,585	0,100
12	4	1,68	67	—	—	—
Wasser						
12h 15′	5,5	1,69	93	12h 23′	0,599	0,102
12h 30′	8,5	1,55	132	12h 27′	0,628	0,107
12h 45′	10,5	0,88	92	12h 37′	0,574	0,098
—	—	—	—	12h 41′	0,581	0,099
1h	58	0,21	122	12h 58′	0,585	0,100
1h 15′	90	0,07	63	1h 01′	0,621	0,106
1h 30′	83	0,10	83	1h 23′	0,571	0,098
1h 45′	15	0,56	84	1h 50′	0,616	0,105
—	—	—	—	1h 52′	0,670	0,114
2h	9	1,03	93	1h 55′	0,681	0,116
2h 15′	8	1,34	107	2h 17′	0,617	0,106

Dieselbe Versuchsanordnung, doch wurde von 11h 10′ bis 2h jede 5. Minute ein Cakes von 6,5 g verzehrt. Das Wasser wurde von 12h 01′ bis 12h 05′ getrunken.

Versuch VI.

Zeit	Harnmenge	Verbrauchte ccm n/200-$Na_2S_2O_3$ pro 0,1 ccm Harn	Total	Zeit	n/200-$Na_2S_2O_3$ (Blut)	% Blutzucker	Hämoglobin
10h Zucker							
10h 30′	17	1,08	184	10h 50′	—	—	105
10h 45′	5	1,37	69	10h 53′	0,657	0,112	—
11h	3,5	2,36	83	11h 01′	0,771	0,130	—
11h 15′	2	3,22	64	11h 20′	—	—	100
11h 30′	4	2,62	105	11h 23′	0,647	0,111	—
11h 45′	5	2,88	144	11h 40′	—	—	100
Wasser							
12h	4	2,26	90	12h 10′	—	—	101
12h 15′	4,5	2,20	99	12h 43′	—	—	96
12h 30′	6,5	1,42	92	12h 52′	0,504	0,086	—
12h 45′	9	1,01	91	—	—	—	—
1h	42	0,31	130	1h 22′	—	—	95
1h 15′	88	0,11	97	1h 28′	0,491	0,084	—
1h 30′	91	0,09	82	1h 44′	0,516	0,088	—
1h 45′	103	0,08	82	1h 57′	—	—	100
2h	56	0,12	67	2h 01′	0,607	0,104	—
2h 15′	22	0,43	95	2h 05′	0,600	0,103	—
2h 30′	13,5	0,50	68	2h 40′	—	—	100
2h 45′	14	0,53	74	2h 51′	0,559	0,096	—
3h	13	0,67	87	2h 54′	0,541	0,092	—

Von 10h bis 2h 40′ wurden jede 5. Minute etwa 3 g Rübenzucker eingenommen. Das Wasser von 11h 58′ bis 12h 02′ getrunken.

Versuch VII.

Zeit	Harnmenge	Reaktion nach Almen	Verbrauchte ccm $n/_{200}$-$Na_2S_2O_3$ pro 1,0 ccm Harn	Total	Zeit	$n/_{200}$-$Na_2S_2O_3$ (Blut)	% Blutzucker
10h 30′	4,0	+	1,78	71			
10h 45′	5,3	Spur	1,74	92			
11h	5,4	"	1,73	93	11h 05′	0,429	0,073
11h 15′	4,8	+	1,75	84	11h 08′	0,442	0,075
11h 30′	5,6	+	1,44	81			
11h 45′	7,2	Spur	1,55	112	11h 41′	0,439	0,075
12h	5,0	"	1,71	86	11h 43′	0,487	0,083
Zucker							
12h 15′	5,1	"	1,74	89	12h 08′	0,467	0,080
12h 30′	4,1		1,75	72			
12h 45′	4,6	0	2,24	103	12h 38′	0,768	0,131
1h	1,3		2,26	29	12h 55′	0,744	0,127
1h 15′	7,4		2,40	178			
1h 30′	4,7	+	2,38	112	1h 25′	0,765	0,131
Wasser							
1h 45′	4,6	+	2,10	97			
2h	5,5	+	1,88	103	2h 05′	0,618	0,106
2h 15′	7,4	Spur	1,70	126			
2h 30′	18,0	0	0,66	119	2h 53′	0,612	0,105
2h 45′	60,0	0	0,13	78	2h 54′	0,616	0,105
3h	78,0	0	0,10	78			
3h 15′	48,0	0	0,14	67			
3h 30′	26,0	0	0,39	101	3h 24′	0,763	0,130
3h 45′	28,0	0	0,38	106	3h 46′	0,684	0,117
4h	33,0	0	0,24	79			
4h 15′	17,5	0	0,42	74	4h 19′	0,799	0,138
4h 30′	8,3	0	0,86	71	4h 25′	0,680	0,117

Dieselbe Versuchsanordnung. Von 12h 10′ bis 4h 10′ wurden jede 5. Minute etwa 3 g Rübenzucker eingenommen. Das Wasser wurde von 1h 32′ bis 1h 35′ getrunken.

Zusammenfassung.

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen ergab sich bei dem untersuchten Individuum:

1. Wenn man bei Karenz eine Wasserdiurese hervorruft, zeigt es sich, daß in einigen Fällen eine geringere Abnahme des Reduktionsvermögens des Blutes eintritt.

2. Während der vermehrten Diurese sinkt das Reduktionsvermögen des Harns weit unter das des Blutes hinab. Der Glucosegehalt des Harns reicht daher konzentrationsweise weit unter den des Blutes hinab.

3. Die absoluten Mengen von ausgeschiedenen reduzierenden Stoffen sind in der Zeiteinheit fast gleich groß und werden nicht durch die Diurese beeinflußt.

4. Es besteht ein gewisses Verhältnis zwischen der in der Zeiteinheit ausgeschiedenen Menge von reduzierenden Stoffen und der gleichzeitigen Konzentration derselben im Blute, indem die ausgeschiedenen Mengen bei einem großen Blutreduktionsvermögen größer und bei geringerem Blutreduktionsvermögen kleiner sind.

Über die Verteilung der Chinaalkaloide im Säugetierorganismus.

Von

Eduard Boecker.

(Aus dem Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch" in Berlin; Abt. Prof. *Cl. Schilling.*)

(Eingegangen am 27. März 1922.)

Die nachfolgend mitgeteilten Untersuchungen bringen einen weiteren Beitrag[1]) zur Frage der Verteilung der Chinaalkaloide im Säugetierorganismus. Sie betreffen die Fragestellungen: Stehn die Chinaalkaloidanteile, welche die einzelnen Organe im behandelten Individuum aus dem Säftestrom aufnehmen, in demselben Zahlenverhältnis zueinander wie die Gewichte der Organe, derart, daß z. B. ein Organ, welches zweimal so schwer ist wie ein anderes, auch die doppelte Alkaloidmenge aufweist? Oder finden sich Unterschiede zwischen diesen Anteilen, die vom Gewicht der Organe mehr oder weniger unabhängig sind, vielmehr augenscheinlich von deren spezifischen Chemismus oder anderen Eigentümlichkeiten bedingt werden — welche also für die betreffenden Organe charakteristisch sind? Werden derartige Unterschiede bei gleichartig behandelten Individuen derselben Art so häufig als von gleicher Größe befunden, daß von einem regelmäßigen Verhalten gesprochen werden kann? Gibt es Organe mit besonders stark ausgeprägter Affinität zu den Chinaalkaloiden?

Im speziellen lagen den Versuchen folgende Fragestellungen zugrunde: Wie verhalten sich bei Meerschweinchen, die in wechselnder Weise mit subcutanen Chinininjektionen behandelt und 1—48 Stunden später getötet wurden, die in der Leber und in den Lungen vorgefundenen Chininanteile zahlenmäßig zueinander? Wie groß ist das Verhältnis:

$$\frac{\text{Chininmenge in den Lungen}}{\text{Gewicht der Lungen}} : \frac{\text{Chininmenge in der Leber}}{\text{Gewicht der Leber}}$$

also das Verhältnis derjenigen Quotienten, die sozusagen den spezifischen Chiningehalt der Organe ausdrücken? Von welchem Einfluß

[1]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. **24**. 1915. — *Schilling* und *Boecker*, Dtsch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 25. — Diese Zeitschr. **103**, 63. — Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 37. — Dtsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 40. — Dtsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 42.

auf diese Zahlenverhältnisse sind Dosis, Zeitpunkt der Tötung oder andere Versuchsbedingungen? — Bei der Wahl der untersuchten Organe der Lungen und der Leber, waren einmal die bequemen Größen- und Gewichtsverhältnisse maßgebend, für die Lunge auch der Umstand, daß mehrere Literaturangaben[1]) sowie eigene Sputumanalysen (5, 6) ein Vorliegen besonderer Affinitätsbeziehungen zwischen Lungengewebe und Chinaalkaloiden wahrscheinlich gemacht hatten. Eine experimentelle Klärung dieser Beziehungen zu versuchen, war besonders naheliegend zu einer Zeit, in der eine gehäuft auftretende, nicht selten mit gefährlichen Pneumonien oder Bronchopneumonien komplizierte Infektionskrankheit, die Influenza, von vielen Seiten mit Chinin oder dem *Morgenroths* zielsicherer Arbeitsmethode zu verdankenden Eukupin behandelt wird, und zwar gerade in Fällen jener Komplikationen mit Erfolg.

Die Wahl der Tierart erfolgte aus ökonomischen Gründen. Daß sich das Meerschweinchen dem Chinin gegenüber prinzipiell anders als der Mensch verhalten könnte, ist unwahrscheinlich. Bei beiden wird ein wenn vielleicht auch verschieden großer Anteil des Alkaloids mit dem Urin ausgeschieden und ein anderer offenbar im Organismus zerstört. Mit zunehmender Dauer nach der Verabfolgung nimmt der Chiningehalt der Organe und Gewebe hier wie dort stetig ab.

Die Applikationsart der subcutanen Injektionen wurde wegen ihrer technischen Einfachheit gewählt. Bei der subcutanen Injektion kommt es nach *Cahn-Bronner* infolge teilweiser Ausfällung des Alkaloids zu Depotbildungen, deren relative Größe offenbar von der Konzentration der Lösung abhängig ist. Während der in Lösung gebliebene Anteil des Alkaloids sehr rasch, ähnlich wie bei der intravenösen Injektion, in den Säftestrom gelangt, werden die Depots erst allmählich, unter Umständen anscheinend sehr langsam abgebaut. Über Einzelheiten dieser Vorgänge sind wir noch wenig unterrichtet. Bei den vorliegenden Versuchen muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß die Resorption bei der Tötung der Tiere vielfach noch nicht beendet war. Da es sich lediglich um eine Klärung der Verteilung des resorbierten Chinins handelte, schien mir die Ungewißheit hierüber irrelevant zu sein.

Der Gang der Versuche war folgender: Gesunden Meerschweinchen wurde eine bestimmte Anzahl von Kubikzentimetern einer 0,5- oder 1,0proz. Lösung von Chinin. muriat. in destilliertem Wasser in einer oder mehreren Sitzungen, auf verschiedene Körperstellen verteilt, subcutan eingespritzt. Die x Stunden nach der letzten Injektion getöteten Tiere wurden sofort eröffnet, Lungen und Leber herausgenommen (bei letzterer die Gallenblase aufgeschnitten), unter der Wasserleitung abgespült, gewogen und in der Reibschale mit Sand zerrieben. Die Chininextraktion erfolgte bei der Hälfte der Fälle nach folgender Me-

[1]) Betr. der Literatur sei auf die früheren Veröffentlichungen verwiesen.

thode (A): Übertragung des Organbreies in einen Erlenmeyerkolben, bei Zimmertemperatur 24stündige Extraktion mit 75 ccm (Lungen) bzw. 150 ccm (Leber) schwefelsauren (1 proz.) Alkohols (60 proz.), mit welchem die Reibschale portionsweise vorsichtig nachgespült worden war; am nächsten Tag möglichst restloses Abgießen des Extraktes und Erneuerung des sauren Alkohols; nach 24stündigem Stehen Abgießen des zweiten Extraktes, worauf noch 3—4 mal während 24 bis 48 Stunden wiederholte Auswaschung des Breies mit je 75 bzw. 100 ccm 1 proz. Schwefelsäure. Die durch ein Papierfilter hindurch vereinigten sauren Extrakte wurden, nach Abstumpfung der Säure, aber noch deutlich sauer geblieben, zwecks Verdampfung des Alkohols auf dem Wasserbad erhitzt, nach Abkühlung durch ein Papierfilter geschickt (wobei Schale und Filter sorgfältig mit 1 proz. Schwefelsäure nachgespült wurden) und darauf im Schütteltrichter nach Alkalisierung mit Äther ausgezogen. Die in üblicher Weise mehrfach gereinigten ätherischen Extrakte hinterließen nach Verdunsten des Äthers kaum sichtbare Rückstände. — In der anderen Hälfte der Fälle erfolgte die Extraktion in etwas anderer Weise (B): Der in der Reibschale befindliche Organbrei wurde durch Verreiben mit pulverisiertem Natr. bicarb. alkalisiert, auf dem Wasserbad getrocknet, wieder fein zerrieben und bei Zimmertemperatur mit 100 bzw. 200 ccm Äther extrahiert. Nach 24 Stunden Abziehen und Erneuerung des Äthers; am 3. Tag nach Abgießen des zweiten Extraktes mehrmalige Auswaschung des Organpulvers mit Äther. Übliche Reinigung der vereinigten Extrakte. — Während der Extraktion wurden die Kölbchen bei beiden Methoden häufig geschüttelt. Aus den fertig ausgezogenen Organzerkleinerungen ließen sich in keiner Weise auch nur noch Spuren von Chinin darstellen.

Der weitere Gang der Untersuchung sei an Hand eines konkreten Falles geschildert:

1. Meerschweinchen von 500 g bekommt am 1. Tag um 11^h und um 2^h je 4 ccm einer 1 proz. Lösung von Chinin. muriat., je 1 ccm auf eine andere Körperstelle, subcutan eingespritzt. Desgleichen am 2. Tag um 9^h 4 ccm. Gesamtdosis binnen 22 Stunden 120 mg. 1 Stunde nach der letzten Injektion Tötung. Gewicht der Lungen = 5,4 g, der Leber = 21,4 g. Extraktion aus Lungen und Leber nach der Methode B. Die Rückstände von den gereinigten Extrakten werden in je 20 ccm 1 proz. Schwefelsäure aufgelöst. Die von der Lunge stammende Extraktlösung (*P*) fluoresciert stark, diejenige von der Leber (*H*) schwach. Mit je 10 ccm der Lösungen wird die Kaliumjodmercuratreaktion (fernerhin als *Hg* bezeichnet) angestellt: Fällungstrübung bei $P = ++$, bei $H = +$. Die restlichen je 10 ccm der Lösungen werden durch Zufügen von je 10 ccm 1 proz. Schwefelsäure aufs Doppelte verdünnt und mit je 10 ccm dieser verdünnten Lösungen wieder die Hg-Reaktion

angestellt: $P = +$, $H =$ schwächer $+$. Bei 4facher Verdünnung der Extraktlösungen ergibt sich: $P = +$, $H = +$; bei 8facher: $P = +$, $H = 0$; bei 16facher: $P = 0$. Die Reaktion wird also bei der P-Lösung erst in doppelt so starker Verdünnung negativ als bei der H-Lösung. Beide Reaktionsreihen sind in der gleichen Sitzung und mit den gleichen Reagentien angestellt worden; die verschiedene Reichweite der Reaktion in den beiden Reihen läßt somit nach meinen Erfahrungen eine approximativ-quantitative Bewertung zu: der Extrakt P enthält ungefähr doppelt soviel Chinin als H, mithin auch die 5,4 g schweren Lungen etwa doppelt soviel als die 21,4 g schwere Leber. Bezeichnen wir die in der Leber vorhanden gewesene Chininmenge mit n, so ist diejenige in der Lunge = ca. 2 n. Der spezifische Chiningehalt der Lungen im Sinne der eingangs gegebenen Definition $\left(= \text{ca. } \frac{2\,\text{n}}{5{,}4}\right)$ verhält sich mithin zu demjenigen der Leber $\left(= \frac{\text{n}}{21{,}4}\right)$ wie ca. 7,9 : 1. Soweit man von der Fiktion ausgehen darf, daß sich das Chinin in beiden Organen in allen ihren Bestandteilen wie in einem Lösungsmittel gleichmäßig verteile, lassen sich die gefundenen Beziehungen dahin ausdrücken: die Konzentration des Chinins ist in der Lunge ca. 7,9 mal so stark als in der Leber.

Die gefundene Verhältniszahl setzt sich aus 2 verschiedenartigen Faktoren zusammen. Der eine ist objektiv durch die Organgewichte gegeben; beim anderen spielen die Leistungsfähigkeit der colorimetrischen Methode, Vertrautsein mit ihren Mängeln und Übung des Untersuchers eine Rolle. Er ist ein Annäherungswert von allerdings für den vorliegenden Zweck genügender Genauigkeit. Wenn oben in der Lunge etwa 2 mal soviel Chinin festgestellt wurde wie in der Leber, so kann ich auf Grund zahlreicher Kontrolluntersuchungen, auch an unbekannten, mir von anderer Seite vorgelegten Lösungen mit ziemlicher Sicherheit schließen, daß der tatsächliche Unterschied nicht größer als 2,5 und nicht kleiner als 1,6 gewesen sein kann; und mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß er sehr nahe bei 2 gelegen hat. Es bedarf kaum der Erwähnung, daß die von mir benutzte Methode [illegible] mehr gemein hat mit den vergeblichen Versuchen, den Chiningehalt [illegible]rin vorbehandelter Menschen vermittels der Hg-Reaktion bestimmen zu wollen. Wie bereits früher, möchte ich auch nochmals betonen, daß nur die in stark verdünnten sauren Chininlösungen mit dem Hg hervorgerufenen zarten Trübungen eine quantitative Auswertung gestatten. — Gelegentlich kommt es vor, daß bei der in geometrischer Progression (2-, 4-, usw.-fach) fortschreitenden Verdünnung der zu vergleichenden Extraktlösungen die letzte positive Reaktion in der einen Reihe stärker ausfällt als diejenige in der anderen Reihe.

In solchen Fällen ist man darauf angewiesen, den Unterschied in der Reaktionsstärke vergleichend abzuschätzen und mit in Rechnung zu setzen; wie auch dann, wenn die Grenzverdünnung der Reaktion nicht scharf ausgeprägt ist. Die Reaktionstrübung erreicht ihr Maximum gewöhnlich erst geraume Zeit nach Zusatz des Reagens; zunächst klar gebliebene Röhrchen können nachträglich trübe werden, also noch positiv reagieren. Diesen Übelständen kann man abhelfen, indem man nur die binnen einem festgesetzten Zeitraum eingetretenen Trübungen berücksichtigt.

Es folgt nunmehr die auszugsweise Mitteilung der übrigen 6 Versuche:

2. Meerschweinchen von 530 g. Dosis: um 10^h 4 ccm, um 3^h 2 ccm einer 1 proz. Lösung von Chinin. muriat. = 60 mg insgesamt. Tötung 24 Stunden nach der letzten Injektion. Gewichte: Lungen = 5,3 g, Leber = 21,3 g. Extraktion nach der Methode A. Der Extrakt aus den Lungen enthält etwas mehr als das Doppelte an Chinin als derjenige aus der Leber, schätzungsweise das 2,2 fache. Verhältnis der Konzentrationen in den Organen = ca. 9,6 : 1.

3. Meerschweinchen von 300 g. Dosis: um 11^h und 3^h 30′ je 4 ccm 1 proz. Lösung = 80 mg insgesamt. Tötung 19 Stunden nach der letzten Injektion. Organgewichte: Lungen = 2,9 g, Leber = 13,1 g. Extraktion nach der Methode A. Der Extrakt aus den Lungen enthält ungefähr doppelt soviel Chinin wie derjenige aus der Leber. Verhältnis der Konzentrationen in den Organen ca. 9 : 1.

4. Meerschweinchen von 680 g. Dosis: am 14. XI. um 11^h und 2^h 30′, am 15. XI. um 10^h je 6 ccm, am 17. XI. um 11^h und 2^h je 4,5 ccm, am 18. XI. um 9^h 6 ccm einer 0,5 proz. Lösung = 165 mg insgesamt binnen 94 Stunden. Tötung 75 Minuten nach der letzten Injektion. Organgewichte: Lungen = 5,75 g, Leber = 26,15 g. Der Extrakt aus den Lungen enthält etwa doppelt soviel Chinin wie derjenige aus der Leber. Verhältnis der Konzentrationen in den Organen ca. 9,1 : 1.

5. Meerschweinchen von 375 g. Dosis: am 7. XI. um 10^h und 1^h und am 8. XI. um 10^h je 4 ccm einer 0,5 proz. Lösung = 60 mg insgesamt binnen 24 Stunden. Tötung 1 Stunde nach der letzten Injektion. Organgewichte: Lungen = 5,8 g, Leber = 13,5 g. Extraktion nach der Methode B. Der Extrakt aus den Lungen enthält etwas weniger Chinin als derjenige aus der Leber; schätzungsweise nur $^5/_6$. Verhältnis der Konzentrationen in Lungen und Leber = ca. 1,9 : 1.

6. Meerschweinchen von 700 g. Dosis: am 22. VIII. 6 ccm, am 23. VIII. um 10^h und 12^h 30′ 6 bzw. 4 ccm einer 0,5 proz. Lösung = insgesamt 80 mg. Tötung $2^1/_2$ Stunden nach der letzten Injektion. Organgewichte: Lungen = 5,6 g, Leber = 25,8 g. Der Extrakt aus den Lungen enthält etwa $1^2/_3$ mal soviel Chinin wie derjenige aus der Leber. Verhältnis der Konzentrationen in den Organen ca. 7,6 : [illegible]

7. Meerschweinchen von 455 g. Dosis: am 12., 13., 14., 15. I. je 4,5 ccm einer 0,3 proz. Lösung = insgesamt 54 mg binnen 24 Stunden. Tötung 48 Stunden nach der letzten Injektion. Organgewichte: Lungen = 4,4 g, Leber = 18,5 g. Die Lungen enthielten mehr Chinin als die Leber. Nähere Feststellungen ließ die Versuchsanordnung nicht zu. Über Versuch 6 und 7 ist bereits an anderer Stelle berichtet worden.

Die nachfolgende Tabelle bringt eine Zusammenstellung der festgestellten Daten. Bezüglich der beiden letzten Spalten vgl. weiter unten. In die Tabelle sind 2 Fälle (8 u. 9) aufgenommen worden, bei denen nur je eins der beiden Organe untersucht wurde.

Nr.	Gewicht des Tieres g	Dosis insgesamt mg	Tötung n. der letzten Injektion	Gewicht der Lungen g	Gewicht der Leber g	Chinin-quotient Lungen: Leber	Chinin in den Lungen mg	Chinin in der Leber mg
1	500	120	1 Std.	5,4	21,4	7,9:1	0,53	0,26
2	530	60	24 „	5,3	23,1	9,6:1	0,13	0,059
3	300	80	19 „	2,9	13,1	9 :1	0,133	0,066
4	680	165	1¼ „	5,75	26,15	9,1:1	0,48	0,24
5	375	60	1 „	5,8	13,5	1,9:1	0,32	0,38
6	700	80	2½ „	5,6	25,8	7,6:1	0,5	0,3
8	310	80	50 Min.	—	12,3	—	—	0,3
9	585	40	24 Std.	4,9	—	—	0,07	—

Aus den mitgeteilten Versuchen ergibt sich für die Fragestellungen folgende Beantwortung: 7 Meerschweinchen wurden in wechselnden Intervallen und Dosen subcutan mit Chinin vorbehandelt und 1—48 Stunden nach der letzten Injektion getötet. Bei 6 von diesen Tieren enthielten die Lungen mehr Chinin als die Leber, und zwar in den 5 Fällen, bei denen eine Berechnung möglich war, das 1,6—2,2fache annäherungsweise. Ein abweichendes Verhalten liegt bei Fall 5 vor, wo in den Lungen nur ca. $^5/_6$ der in der Leber festgestellten Chininmenge gefunden wurde. — Das Verhältnis

$$\frac{\text{Chininmenge in den Lungen}}{\text{Gewicht der Lungen}} : \frac{\text{Chininmenge in der Leber}}{\text{Gewicht der Leber}}$$

beträgt bei den Tieren 1, 2, 3, 4, 6: 7,9 bzw. 9,6 bzw. 9 bzw. 9,1 bzw. 7,6 : 1, ist mithin von einer Gleichartigkeit der Größenordnung nach, die bemerkenswert bleibt, auch wenn man in Betracht zieht, daß die Zahlen nur Annäherungswerte sind. Fall 5 bildet auch hier eine Ausnahme, indem das Konzentrationsverhältnis zwischen Lungen und Leber nur 1,9 : 1 beträgt. Wie das abweichende Verhalten zu erklären ist, muß dahingestellt bleiben. Das Tier unterschied sich in einer Hinsicht von den übrigen: während bei diesen das Gewichtsverhältnis Leber : Lungen zwischen 4 und 4,6 : 1 lag, einer bei mittelgroßen Meerschweinchen gewöhnlichen Größe, betrug es bei Fall 5 nur 2,3 : 1. Möglicherweise hat zugleich mit diesem abweichenden Gewichtsverhältnis ein hinsichtlich der Affinität zum Chinin abweichender Chemismus in beiden Organen vorgelegen. In diesem Zusammenhang sei jedoch — aus einer vorhergehenden Veröffentlichung — darauf hingewiesen, daß in gleichartigen Versuchen mit dem *Morgenroth*schen Eukupin an 3 Meerschweinchen, bei denen das Gewichtsverhältnis Leber: Lungen 5,9, bzw. 3, bzw. 4,4 : 1 betrug, das Konzentrationsverhältnis des Alkaloids in beiden Organen trotzdem nur geringe Unterschiede aufwies: 8 bzw. 8,6 bzw. 9,4 : 1. Hier hat sich also zum mindesten kein Anhaltspunkt für das Obwalten eines konditionalen

Zusammenhangs zwischen Gewichtsverhältnis der Organe und Konzentrationsverhältnis ergeben.

Wegen der besonderen Resorptionsverhältnisse bei der subcutanen Applikation — zunächst Eindringen größerer Alkaloidanteile in den Kreislauf, später lange anhaltende Resorption geringfügiger Anteile — wäre vorläufig immerhin an die Möglichkeit zu denken, daß die Verteilungsverhältnisse sofort nach der Injektion und bis etwa zum Ablauf der ersten Stunde andere als später sein könnten. Möglicherweise insofern, als die Leber von dem ersten Alkaloidschub zunächst einen unverhältnismäßig großen Anteil aufnähme. Bei Fall 5, 1 und 4 erfolgte die Tötung 1 bzw. $1^1/_4$ Stunde nach der letzten Injektion. Infolge individueller Variation könnte nun bei Fall 5 die Tötung noch in die erste Phase der Verteilung, bei 1 und 4 jedoch in die spätere, dauernd bleibende gefallen sein. Eine Klärung dieser Fragen wie überhaupt der statistischen Bedeutung des Falles 5 kann nur eine weitere Untersuchungsreihe bringen. Wenn man die Gesamtheit der bisherigen Versuchsresultate, mit Einschluß des unten beschriebenen Optochinfalles und der 3 früher veröffentlichten Eukupinfälle übersieht, gewinnt man jedenfalls den Eindruck, daß (von 1 Stunde nach der letzten Injektion ab) der Zeitpunkt der Tötung nicht von maßgebendem Einfluß auf die festgestellten Verteilungsverhältnisse war. Und das gleiche dürfte für die zeitlichen Verhältnisse der Applikation überhaupt (Intervalle, Dauer der Behandlung) wie auch für die Größe der Dosen gelten.

In einer früheren Veröffentlichung (3) habe ich eine vorläufige Arbeitshypothese aufgestellt, nach welcher in den Säftekreislauf gelangtes Chinin sich zwischen Säften, Geweben und Organen, wie in einem vielphasigen Verteilungssystem, nach zahlenmäßigen Verhältnissen verteilen sollte, die lediglich durch die Eigenschaften des Alkaloids einerseits, durch den Chemismus der Säfte, Gewebe und Organe andererseits bedingt seien, nicht aber durch die Größe der Dosis, zeitliche Verhältnisse und die Art der Applikation. (Bezüglich der nach peroraler Verabfolgung vorliegenden Verhältnisse wurde schon damals auf die Tatsache hingewiesen, daß ein Teil des Chinins auf seinem Resorptionsweg zum großen Kreislauf die bindende und zerstörende Leber passieren muß. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, daß, solange noch Chinin vom Darm her in den Pfortaderkreislauf gelangt, die Verteilungsverhältnisse anders als später seien. Diese Möglichkeit sei mit Rücksicht auf einen weiter unten berichteten Versuch nochmals erwähnt.) — Ferner wurde angenommen, daß die einmal gegebenen Verteilungsverhältnisse konstant bleiben, trotzdem einige Organe Chinin aus dem Organismus entfernen, andere dasselbe zerstören. Und zwar würde die Konstanz der Verteilungsverhältnisse deshalb gewahrt, weil die ausscheidenden und zerstörenden Organe in dem Maße, wie sie sich des

Chinins entledigen, neue Anteile aus dem Säftestrom aufnähmen, der seinerseits die übrigen Gewebe und Organe in entsprechendem Maße auswüsche.

Die sachliche Berechtigung dieser Hypothese ist experimentell zu prüfen: indem man bei einer Anzahl von mit gleicher Applikationsart behandelten Tieren der gleichen Art das Konzentrationsverhältnis des Alkaloids für dieselben 2, im übrigen beliebigen Organe feststellt. Gleicht sich die Hypothese der Wirklichkeit an, so wäre zu erwarten, daß sich das Konzentrationsverhältnis unabhängig von Dosis, Zeitverhältnissen, Gewichtsverhältnissen der Tiere in allen Fällen als von gleicher Größe herausstellen müßte. Soweit bei den einzelnen Versuchstieren keine wesentlichen Variationen im Verhalten der Organe gegenüber dem Chinin vorkommen. Zu diesem Problem eine statistische Feststellung zu liefern, war mit ein Zweck der vorliegenden Untersuchungen. Ihre Ergebnisse deuten, trotz der einen erheblichen Abweichung, auf ein regelgemäßes Verhalten; welches, so darf man wohl vermuten, in dem Obwalten gesetzmäßiger Verteilungsbeziehungen seinen Ursprung hat.

Des praktischen Interesses wegen sind, obgleich nicht unmittelbar zum Thema gehörend, noch die absoluten Mengen der jeweils in Lungen und Leber gefundenen Chininanteile in der Tabelle angegeben, wie sie sich unter Vergleichung einer der beiden Extraktlösungen, von den Lungen oder von der Leber, mit einer Standardlösung annähernd errechnen lassen. Bei der Beurteilung dieser Werte, die ausdrücklich als nur annähernd zutreffend bezeichnet werden, sind 2 Tatsachen zu berücksichtigen: einmal die allmähliche Entfernung des Chinins aus dem Organismus, durch Ausscheidung und Zerstörung, eine Tatsache, die auch in der Tabelle zutage tritt. Ferner der Umstand, daß die durch die subcutanen Injektionen angelegten Depots nur allmählich vom Säftestrom ausgelaugt werden. So gelangt man zu der Auffassung, *daß es bei der gewählten Versuchsanordnung zu einer Anreicherung des Chinins in den Lungen kommt*, d. h. daß diese Organe tatsächlich mehr Alkaloid aufnehmen, als ihnen, ihrem Gewichtsanteil im Gesamtorganismus entsprechend, zukäme. Diese Annahme einer Anreicherung steht in bestem Einklang mit der Tatsache, daß es im Meerschweinchen zum mindesten *ein* Organ gibt, die Leber, das in der Mehrzahl der untersuchten Fälle nur etwa die Hälfte der in den Lungen vorhandenen Chininmenge enthielt, trotzdem es wesentlich schwerer als jene ist.

Bei den nachfolgend mitgeteilten 2 Versuchen handelt es sich um orientierende, vorläufig vereinzelt gebliebene Feststellungen; ihre Veröffentlichung geschieht in Hinsicht ihres praktischen Interesses.

1. Chiningehalt von Leber und Lungen nach peroraler Verabfolgung beim Meerschweinchen.

Einem gesunden Tier von 490 g werden vermittels einer tief in den Rachen geschobenen Pravazspritze ohne Kanüle in mehreren Sitzungen binnen 4 Stunden nach und nach 6 ccm einer 2 proz. Lösung von Chinin. mur. eingeflößt. Da ein Teil der Lösung aus dem Maule fließt, auch einige Male Erbrechen erfolgt, läßt sich nicht feststellen, wieviel Chinin in den Magen gelangt ist. Tötung nach 24 Stunden. Verarbeitung der Organe wie oben; Extraktion nach der Methode B. Gewicht der Lungen 4,3 g; Chiningehalt ca. 0,15 mg, Gewicht der Leber 24,2 g; Chiningehalt ca. 0,206 mg. Auch hier ist also die Konzentration des Chinins in den Lungen stärker als in der Leber gewesen, und zwar etwa 4,3 mal. Ob dieser Konzentrationsunterschied für die gewählten Versuchsbedingungen charakteristisch ist, muß dahingestellt bleiben.

2. *Optochin*gehalt von Lungen und Leber nach subcutaner Applikation beim Meerschweinchen. (Die Bestimmung des Optochingehaltes der Organextrakte erfolgte vermittels der Hg-Reaktion. Da ich in derartigen Optochinanalysen nicht über die gleiche Erfahrung wie beim Chinin und Eukupin verfüge, sind die gefundenen Zahlen vielleicht von mehr bedingtem Wert. Ihre Veröffentlichung erfolgt im Hinblick auf ihre orientierende Bedeutung.)

Gesundes Tier von 450 g bekommt subcutan injiziert am 1. Tag 2 × 1 ccm, am 2. Tag 3 × 1 ccm, am 3. Tag 3 × 1 ccm einer 1 proz. Lösung von Optochin. muriat. Dosis: binnen 48 Stunden insgesamt 80 mg. Tötung $1^1/_2$ Stunde nach der letzten Injektion. Der Gang der Untersuchung ist genau der gleiche wie bei den Chinintieren; Extraktion nach der Methode B. Gewicht der Lungen 5,07 g; Optochingehalt ca. 0,71 mg; Gewicht der Leber 16,9 g; Optochingehalt ca. 0,225 mg. Auch hier ist mithin die Konzentration des Alkaloids in den Lungen stärker als in der Leber gewesen, nämlich ca. 10,5 mal stärker.

Wie beim vorhergehenden Versuch muß auch hier die Frage offenbleiben, ob der gefundene Konzentrationsunterschied für die gewählten Bedingungen charakteristisch ist.

Berichtigung.

Bd. 128, Seite vor dem Text, Zeile 10 von oben lies Barmbecker statt Eppendorfer.

Biochemische Zeitschrift

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Würzburg, C. von Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, A. von Wassermann-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, M. Bergmann-Berlin-Dahlem, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin-Dahlem, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger-Groningen, P. Hári-Budapest, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Abo, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin-Dahlem, K. Hess-Berlin-Dahlem, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, A. Koch-Göttingen, M. Kochmann-Halle a. S., F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, S. Loewe-Dorpat, A. Loewy-Berlin, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Greifswald, L. Michaelis-Berlin, H. Molisch-Wien, J. Morgenroth-Berlin, E. Münzer-Prag, H. Murschhauser-Düsseldorf, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, J. K. Parnas-Lemberg, Th. Paul-München, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-St. Petersburg, T. Sasaki-Tokio, A. Scheunert-Berlin, A. Schloßmann-Düsseldorf, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Basel, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, H. v. Tappeiner-München, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, P. Trendelenburg-Rostock, O. Warburg-Berlin, E. Widmark-Lund, W. Wichowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hundertdreißigster Band

Viertes bis sechstes Heft

Ausgegeben am 20. Juli 1922



Berlin
Verlag von Julius Springer
1922

Die **Biochemische Zeitschrift**

erscheint in zwanglosen Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis des laufenden Bandes im Umfange von 40 Bogen beträgt M. 360.—.

Der für diese Zeitschrift berechnete Bandpreis hat seine Gültigkeit nur während der Dauer des Erscheinens. Der Verlag muß sich bei der Unsicherheit der Entwicklung der wirtschaftlichen Verhältnisse vorbehalten, den zurzeit geltenden Preis nach Abschluß des Bandes zu erhöhen.

Die Biochemische Zeitschrift ist durch jede Buchhandlung sowie durch die unterzeichnete Verlagsbuchhandlung zu beziehen.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als 1½ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens 2 Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Redakteur,

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,

zu richten.

Die Verfasser erhalten 100 Sonderabdrücke ihrer Abhandlungen kostenfrei, bis zu einem Umfang von 1½ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur 75, weitere gegen Berechnung. Für den 16seitigen Druckbogen wird ein Honorar von M. 40.— gezahlt.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer

Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

---

130. Band. **Inhaltsverzeichnis.** Heft 4/6

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite!

W. Palladin †.

Am 3. Februar 1922 starb Professor Dr. *Wladimir Palladin* in St. Petersburg. Der hervorragende russische Gelehrte, der zur wissenschaftlichen Welt Deutschlands viele Beziehungen unterhalten hat, war am 11. Juli 1859 in Moskau geboren. In den Jahren 1879—82 studierte er Naturwissenschaften, besonders Botanik unter Leitung der Professoren *Timiriazeff* und *Goroshankin.* Kaum 27 jährig wurde er Dozent am Institut für Land- und Forstwissenschaft in Nowaja-Alexandria, Gouvernement Lublin, um dann 3 Jahre später als ordentlicher Professor der Anatomie und Physiologie der Pflanzen an die Universität Charkow überzusiedeln. Im Jahre 1897 vertauschte er diese Stelle mit dem Lehrstuhl an der Universität und am polytechnischen Institut zu Warschau. 1901 berief ihn die Universität Petersburg, und er fand auch die Zeit, daneben Unterrichtstätigkeit an der Frauen-Hochschule in Petersburg auszuüben. 1917 begab sich *Palladin* nach der Krim, wo er Vorlesungen an der neugegründeten Universität Simpheropol hielt und später die Direktion des Nikitzky-Botanischen Gartens bei Jalta übernahm.

Seit 1906 gehörte er der Akademie der Wissenschaften in Petersburg an und wurde gleichzeitig korrespondierendes Mitglied der deutschen botanischen Gesellschaft in Berlin. Im folgenden Jahre zeichnete ihn die Universität Upsala durch die Verleihung des medizinischen Doktorgrades ehrenhalber aus.

Palladin hat eine außerordentlich umfassende Tätigkeit entwickelt. Seine Lehrbücher über Physiologie,

Anatomie, Morphologie, Systematik sowie über Veränderlichkeit der Pflanzen sind in vielfachen Auflagen, zumeist russisch, erschienen. In deutscher Sprache gab er im Jahre 1911 ein Lehrbuch der Pflanzenphysiologie heraus. Seine Arbeiten bewegen sich hauptsächlich auf dem Gebiete der Biochemie der Vegetabilien. Sie sind so zahlreich, daß sie in diesen seinem Gedächtnis gewidmeten kurzen Zeilen nicht aufgeführt werden können. Ein großer Teil seiner Publikationen ist in der „Biochemischen Zeitschrift" erschienen, in der auch noch einige kurz vor seinem Hinscheiden eingegangene Abhandlungen veröffentlicht sind. Hervorgehoben seien nur seine Mitteilungen über die anärobe Atmung der Pflanzen und deren Zusammenhang mit der alkoholischen Gärung, über die Atmungspigmente der Vegetabilien und ihre reduzierenden Faktoren. Diese Untersuchungen *Palladins* haben Interesse auch über das Gebiet seiner engeren Fachgenossen hinaus erregt und sichern ihm, ebenso wie seine erfolgreiche Tätigkeit als akademischer Lehrer und Verfasser wertvoller Unterrichtsbücher eine ehrenvolle und dankbare Erinnerung.

C. N.

Die Verwertung des Harnstoffs für die Milchleistung nach Versuchen an Kühen[1]).

Von

W. Völtz, W. Dietrich und **H. Jantzon.**

(Aus der ernährungsphysiologischen Abteilung des Instituts für Gärungsgewerbe der Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 18. März 1922.)

Vor einiger Zeit hat der eine von uns in Versuchen an Hammellämmern, die z. B. an einem Tier ununterbrochen 8 Monate durchgeführt wurden, nachgewiesen[2]), daß der Harnstoff die Rolle des Nahrungseiweißes im Stoffwechsel von Wiederkäuern zu übernehmen geeignet ist. Das betreffende Lamm hatte z. B. innerhalb 155tägiger ununterbrochener Bilanzversuche 7557 g Fleisch, Wolle und andere Epidermoidalgebilde angesetzt. Die Ergebnisse der Bilanzversuche bezüglich des Fleischansatzes (N · 30) stimmten mit den Zahlen für die Körpergewichtszunahmen befriedigend überein. Resorbierbarer Stickstoff hatte nur in Form von Harnstoff zur Verfügung gestanden. Hierdurch war in Übereinstimmung mit den Bilanzversuchen an anderen Lämmern die Fleischbildung aus Harnstoff und Kohlenhydraten bewiesen. Letztere kann nur auf dem Umwege der Synthese des Harnstoffs zu Bakterieneiweiß erfolgen, weil ein einzelnes Amid von den tierischen Zellen zu Körpereiweiß nicht aufgebaut zu werden vermag. Da das Fleischeiweiß unter bestimmten Bedingungen, nämlich bei ungenügender Proteinzufuhr, bekanntlich zur Milchbildung herangezogen werden kann, war durch die erwähnten Versuche auch die Verwertbarkeit des Harnstoffs für die Milchbildung zu folgern; freilich wäre hieraus nicht ohne weiteres zu schließen, in welchem Umfange das der Fall ist bzw. um einen speziellen Fall heranzuziehen, ob Harnstoff und Kohlenhydrate in dem gleichen Umfange für die Milchbildung verwendet werden können wie ein proteinreiches Kraftfuttermittel mit demselben Gehalt an verdaulichem Stickstoff und Stärkewert. Schon vor Beginn der eben erwähnten Bilanzversuche an Lämmern, und zwar im Jahre 1917, sind orientierende

[1]) Vorläufige Mitteilungen siehe in den Jahresberichten der ernährungsphysiologischen Abteilung des Instituts für Gärungsgewerbe, Wochenschr. f. Brauerei, Jg. 1920 und 1921 und Zeitschr. f. Spiritusind. Jg. 1921 und 1922.

[2]) *W. Völtz*, diese Zeitschr. **102**, 151—227. 1920.

Fütterungsversuche mit dem Carbamid an 3 Milchkühen der ernährungsphysiologischen Abteilung unseres Instituts ausgeführt worden. Aus äußeren Gründen mußte allerdings auf die Anstellung exakter Versuche verzichtet werden. Die 3 Kühe erhielten während mehrerer Monate täglich 200 g Harnstoff pro Kopf als Futterzulage; Steigerungen der Milchsekretion infolge der Harnstoffütterung wurden regelmäßig beobachtet, wenngleich der Effekt des Harnstoffes auf die Milchleistung hier nicht zahlenmäßig bestimmt wurde. Die Kühe vertrugen die Harnstoffgabe von 200 g pro Tag vom ersten Tage ab ohne jede Gesundheitsstörung.

Im April 1919 wurden zunächst die Versuche über Harnstofftoleranz an der einzigen dem Institut verbliebenen schon sehr alten Kuh fortgesetzt; das Gewicht derselben war 500 kg. die Tagesgabe betrug 3 kg Strohhäcksel, 3 kg Strohstoff, 4 kg Zuckerschnitzel, 300 g Harnstoff, 100 g $CaCO_3$, 30 g NaCl und 30 g $Na_2HPO_4 + 12$ aq. In den ersten Tagen wurde infolge der starken Harnstoffgabe eine kleine Störung des Wohlbefindens beobachtet, z. B. erfolgte das Wiederkäuen nur selten; trotzdem wurden die 300 g Harnstoff (die eine wesentliche Überschreitung der Höchstgabe bedeuten) weiter verabreicht, ohne daß sich im Laufe des Versuches (5 Wochen) eine weitere Gesundheitsstörung gezeigt hätte. Später haben wir nur immer 150—200 g Harnstoff pro Kuh verabreicht und empfehlen auch, schon in Anbetracht des hohen Stickstoffgehaltes über diese Gabe nicht hinauszugehen. 300 g Harnstoff enthalten rund 140 g Stickstoff, entsprechend 876 g Rohprotein bzw. 1,75 kg Rohprotein pro 1000 kg Lebendgewicht. Da die in der Praxis verabreichten Rationen stets schon erhebliche Proteinmengen enthalten, würde eine so hohe Gabe von 300 g Harnstoff zumeist auch eine Verschwendung an stickstoffhaltigen Nährstoffen bedeuten.

Die Versuche an der alten Kuh, welche anfänglich quantitativ durchgeführt wurden, führten deshalb nicht zu zahlenmäßigen Ergebnissen über die Verwertung des Harnstoffs für die Milchbildung, weil die Kuh in der vergleichenden Grundfutterperiode ohne Harnstoff eine verminderte Freßlust hatte und im Durchschnitt nur rund 60% der in der Harnstoffperiode aufgenommenen Rationen verzehrte. Wir nehmen deshalb auch von einer Mitteilung der Versuchsergebnisse Abstand. Die hier zutage getretene appetitanregende Wirkung des Harnstoffs haben wir sowohl bei den erwähnten Bilanzversuchen an Lämmern als auch bei den folgenden Versuchen an Milchkühen beobachtet. So gelang es uns vielfach während der letzten Tage der Grundfutterperioden nur schwer, den Kühen die ganze Ration beizubringen und wir mußten die betreffenden Perioden aus diesem Grunde mehrfach früher abbrechen und zur Harnstoffütterung übergehen als beabsichtigt war. Regelmäßig bewirkte die Harnstoffzufuhr eine Steigerung der Freßlust.

Wir beabsichtigten, bei den folgenden Versuchen den Effekt der Harnstoffzulagen allein und zusammen mit stickstoffarmen Futtermitteln im Vergleich zu einem Futtermittel mit dem gleichen Gehalt an verdaulichem Rohprotein und Stärkewert festzustellen, um so auch zu einem Bild über die Rentabilität der Harnstofffütterung für die Milchleistung zu gelangen.

Bei annähernd gleichen Milchertragszahlen für die einzelnen Tage jeder Grundfutterperiode und bei gleicher Versuchsdauer sämtlicher Perioden jeder Reihe wäre es nur erforderlich gewesen, die arithmetischen Mittel der beiden Grundfutterperioden jeder Reihe zu berechnen und von den betreffenden Hauptperioden in Abzug zu bringen. Etwas komplizierter liegen die Verhältnisse bei unseren vorliegenden Versuchen. Zum Teil war die Dauer der einzelnen Perioden der betreffenden Versuchsreihe eine verschieden lange. Ferner hatten die Zahlen für die Milcherträge in den Grundfutterperioden nicht selten eine fallende Tendenz; endlich zeigte sich zumeist eine Nachwirkung der in den Hauptperioden gereichten Nährstoffzulagen an den ersten Tagen der folgenden Grundfutterperioden. Diese Tage durften bei der Berechnung der Mittelwerte für die abschließenden Perioden nicht angerechnet werden. Über die Methode, nach welcher unter Berücksichtigung dieser Umstände die Milcherträge aus dem Grundfutter für die Hauptperioden berechnet wurden, vergleiche unter Versuchsreihe A, S. 334.

Wir haben zunächst durch Vorversuche festgestellt, welche Futtermengen die Kühe in maximo während einiger Wochen restlos verzehrten; diese Futtermengen wurden während der Versuche verabreicht. Wenn die Nährstoffzufuhr trotzdem knapp bemessen war, so ist das darauf zurückzuführen, daß wir genötigt waren, ein minderwertiges Wiesenheu zu verfüttern, welches die Kühe nur ungern in größeren Mengen verzehrten[1]).

Versuchsreihe A an der Kuh Nr. 5 und Bilanzversuche an dem Hammel Nr. 2.

Die Versuche begannen am 4. V. 1920. Die Kuh hatte am 12. IV. 1920 gekalbt, sie befand sich hiernach in der 3. Woche der Lactation und lieferte bei Versuchsbeginn täglich ungefähr 13 kg Milch. Es sei gleich hier darauf hingewiesen, daß der Fettgehalt der Milch dieser Kuh schon vor den Harnstoffversuchen mit etwa $2^1/_2\%$ abnorm niedrig war, und daß er auch längere Zeit nach dem Abschluß der Versuche so niedrig blieb; die große Fettarmut der Milch ist also eine individuelle Eigenschaft des Tieres. Bezüglich der Versuchsanstellung ist folgendes zu bemerken:

[1]) Ausgenommen hiervon ist die Versuchsreihe A an der Kuh Nr. 5, für die ein Wiesenheu guter Beschaffenheit zur Verfügung stand.

Die Versuchsreihe bestand aus 6 Perioden, und zwar den Perioden I—III mit einem geringen Proteingehalt des Grundfutters (Heu und eingesäuerte gedämpfte Kartoffeln) und den Perioden IV—VI mit einem höheren Proteingehalt des Grundfutters (Heu + eingesäuerte gedämpfte Kartoffeln + Malzkeime). In den Perioden I, III, IV und VI erhielt die Kuh nur das Grundfutter; in den Hauptperioden II und V wurde eine Zulage von 150 g Harnstoff pro Tag gegeben. Die Zusammensetzung der Futtermittel für diese Versuchsreihe enthält die folgende Tabelle I:

Tabelle I.

Zusammensetzung der Futtermittel für die Versuchsreihe A.

	Heu	Eingesäuerte gedämpfte Kartoffeln	Malzkeime	Harnstoff
Trockensubstanz	86,40	25,76	78,26	98,70
Asche	5,32	3,05	6,57	0,25
Organische Substanz	81,08	22,71	71,69	98,45
				Stickstoff:
Rohprotein	6,88	2,29	24,73	46,20
Reineiweiß	6,15	1,36	18,56	—
Amide	0,73	0,93	6,17	98,45
Rohfett	2,43	0,05	1,00	—
Rohfaser	25,26	1,62	13,90	—
N-freie Extraktstoffe	46,51	18,75	32,06	—
Gesamtsäure	—	3,82	—	—
Milchsäure	—	3,07	—	—
Freie flüchtige Fettsäuren	—	0,47	—	—
Gebundene flüchtige Fettsäuren	—	0,28	—	—
Ammoniak	—	0,03	—	—
Alkohol	—	0,38	—	—

Die Tagesharnstoffgabe wurde in 2 Teile geteilt und in ein wenig Wasser gelöst auf das in der Krippe befindliche Futter gegossen und untermischt. Die Futteraufnahme erfolgte nahezu quantitativ, was durch besondere Einrichtungen der Krippe ermöglicht wurde. Das Heu war vor Beginn der Versuche für die ganze Versuchsdauer gehäckselt, gemischt und analysiert worden. Die Abwägung der Tagesgaben erfolgte unmittelbar nach der Ausführung einer Wasserbestimmung für eine Anzahl Versuchstage und so fort bis zum Abschluß der Versuche. Von den in der Ration enthaltenen eingesäuerten Kartoffeln wurde täglich der gleiche Prozentsatz entnommen, fortlaufend getrocknet und schließlich analysiert. Die Wägungen der Kuh erfolgten morgens nach dem Melken unmittelbar vor der ersten Fütterung. Die Kuh wurde täglich 3 mal gemolken und die Milch gewogen; in Durchschnittsproben erfolgte die Fettbestimmung nach *Gerber* und die Bestimmung des spezifischen Gewichtes zwecks Berechnung des Trockensubstanzgehaltes nach *Fleischmann*. Ferner wurde eine Milchsammelprobe aus jeder

Periode entnommen, getrocknet und darin Trockensubstanz, Stickstoff und Aschegehalt bestimmt. In gleicher Weise wurde bei unseren sämtlichen Versuchen an Milchkühen verfahren. Bei den Versuchen, in denen mehrere Kühe eingestellt waren, wurden nicht etwa die gesamten Tagesrationen der Kühe gewogen, sondern jede Kuh erhielt ihr tägliches Futterquantum besonders zugewogen.

Zu den Daten über den Gehalt der Milch an Protein haben wir für sämtliche Versuche noch folgendes zu bemerken. Nach *Fleischmann*, Lehrbuch der Milchwirtschaft, setzen sich die Proteine der Kuhmilch zusammen aus im Durchschnitt 90% Casein mit 15,65% N, 10% Lactalbumin mit 15,77% N und sehr kleinen Mengen Lactoglobulin. Hieraus berechnet sich ein durchschnittlicher N-Gehalt der Milchproteine von 15,7%. Wir haben nicht mit diesem Prozentsatz, sondern mit 16% gerechnet, um den Proteingehalt der Milch mit dem des Futters streng vergleichen zu können. Hierdurch ist nur eine ganz unwesentliche Abweichung von den genauen Zahlen bedingt.

Mit genau 10%[1]) der in den Perioden I—III verfütterten Tagesgaben wurden außerdem Bilanzversuche an einem Hammel durchgeführt, um den verdaulichen Anteil der Nährstoffe zu ermitteln.

Perioden I—III (Proteinärmere Ernährung).

Bei diesen Versuchen wurden folgende Futtermittel verabreicht:

Periode I (15 Tage)	6 kg Heu, 12,5 kg gedämpfte und eingesäuerte Kartoffeln, 100 g kohlensaurer Kalk, 30 g Kochsalz, 30 g Natriumphosphat (sec.);
Periode II (10 Tage) ebenso, ferner . .	150 g Harnstoff und 20 g Kaliumsulfat[2]),
Periode III (10 Tage)	ebenso wie Periode I.

Wir lassen nun zunächst die Ergebnisse der Bilanzversuche an dem Hammel Nr. 2 folgen (s. S. 328).

Nehmen wir auf Grund früherer Versuche (l. c.) an, daß der Harnstoffstickstoff zu 85% verdaulich ist, so wären hiernach durch 1 kg Harnstoff von den stickstoffhaltigen Nährstoffen des Grundfutters (Heu + eingesäuerte Kartoffeln) 661 g Protein mehr resorbiert worden als in der Grundfutterperiode I ohne Harnstoff.

Die Tabellen VI—X enthalten die erforderlichen Daten über den Gehalt der in den Perioden I—III verabreichten Tagesgaben für die Kuh Nr. 5 an Rohnährstoffen, verdaulichen Nährstoffen und Stärkewert, sowie die Milcherträge.

[1]) Nur wurde in der Harnstoffperiode II (S. 330) die tägliche Kalkgabe für den Hammel um 10 g erhöht.

[2]) Siehe dazu diese Zeitschr. **102**, 163.

Periode I. Grundfutter.

Versuchsdauer: 22 Tage (vom 23. Juli bis 14. August 1920). Versuchstier: Hammel Nr. 2. Die Vorfütterung dauerte 14 Tage, der Hauptversuch 8 Tage. Das Tier verzehrte täglich:

	585,4 g Heu	mit 518,40 g Trockensubstanz und 6,61 g N
	1286,4 g gedämpfte und eingesäuerte Kartoffeln	„ 322,10 g „ „ 4,58 g N
und	16,0 g Salze	Summe: 840,50 g Trockensubstanz und 11,19 g N

Tabelle II.

Stickstoffbilanzen, Lebendgewichte, Kotgewichte, Harnmengen, Trinkwasser, Stalltemperaturen.

Datum	Stickstoffausscheidung						N-Ansatz		Gewicht des Tieres	Gewicht des frisch. Kotes	Harnmengen	Trinkwasser	Stalltemperatur
	im Harn		im Kot		Summe								
1920	g	% der Zufuhr	g	% der Zufuhr	g	% der Zufuhr	g	% der Zufuhr	kg	g	ccm	ccm	°C
6./7. VIII.	3,78	—	7,94	—	11,72	—	−0,53	—	44,5	704,1	2300	1800	—
7./8. VIII.	3,42	—	7,94	—	11,36	—	−0,17	—	—	750,8	1900	1400	19,5
8./9. VIII.	2,99	26,8	7,94	71,0	10,93	97,8	+0,26	+2,2	—	677,0	1600	1800	21,0
9./10. VIII.	2,97	26,5	7,94	71,0	10,91	97,5	+0,28	+2,5	—	651,3	1100	1650	22,5
10./11. VIII.	2,99	26,8	7,94	71,0	10,93	97,8	+0,26	+2,2	43,9	801,0	1400	1500	21,5
11./12. VIII.	2,94	26,3	7,94	71,0	10,88	97,3	+0,31	+2,8	—	869,4	1400	1450	19,5
12./13. VIII.	2,93	26,2	7,94	71,0	10,87	97,2	+0,32	+2,8	—	1031,7	1400	1350	20,0
13./14. VIII.	2,71	24,2	7,94	71,0	10,65	95,2	+0,54	+4,8	44,3	789,4	1300	1350	21,0
Mittel der letzten 6 Tage	2,92	26,1	7,94	71,0	10,86	97,1	+0,33	+2,9	44,2*)	803,3	1367	1517	20,9

Das Rohprotein wurde also zu 29,0% resorbiert. Pro Kilo Lebendgewicht und Tag erhielt das Tier 0,253 g Stickstoff bezw. 0,074 g**) resorbierbaren Stickstoff. Die tägliche Gewichtsabnahme betrug im Mittel 25 g. Der Hammel befindet sich nahezu im Stickstoffgleichgewicht.

*) Mittel aus sämtlichen 3 Wägungen.
**) = 0,459 g resorbierbares Rohprotein.

Der in der vorliegenden Periode I produzierte Kot wog im Mittel pro Tag lufttrocken 375,0 g und enthielt in Prozenten:

Trockensubstanz	Asche	Organische Substanz	Rohprotein	Reineiweiß	Amide	Rohfett	Rohfaser	N-freie Extraktstoffe
86,43%	12,96%	73,47%	13,23%	10,03%	3,20%	2,86%	23,48%	33,90%

Hieraus ergibt sich der folgende Gehalt an Einzelbestandteilen in Gramm pro Tag:

Lufttrockener Kot	Trockensubstanz	Asche	Organische Substanz	Rohprotein	Reineiweiß	Amide	Rohfett	Rohfaser	N-freie Extraktstoffe
375,0 g	324,11 g	48,60 g	275,51 g	49,61 g	37,61 g	12,00 g	10,72 g	88,04 g	127,14 g

Die folgende Tabelle enthält die Verdauungswerte für die Nährstoffe des in der vorliegenden Periode I verzehrten Futters:

Tabelle III.

	Trockensubstanz g	Organische Substanz g	Rohprotein g	Reineiweiß g	Amide g	Rohfett g	Rohfaser g	N-freie Extraktstoffe g	Stärkewert pro Kopf kg	Stärkewert pro 1000 kg Lebendgew. kg
585,4 g Heu	518,40	486,50	41,28	36,90	4,38	14,58	151,56	279,08	—	—
1286,4 g gesäuerte, gedämpfte Kartoffeln	322,10	284,02	28,63	17,01	11,62	0,64	20,32	234,43	—	—
16,0 g Salze (10 g $CaCO_3$, 3 g Na-phosphat und 3 g NaCl)	16,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Summe	856,50	770,52	69,91	53,91	16,00	15,22	171,88	513,51	—	—
Der Kot enthielt	324,11	275,51	49,61	37,61	12,00	10,72	88,04	127,14	—	—
Also resorbiert g	532,39	495,01	20,30	16,30	4,00	4,50	83,84	386,37	0,412	9,3
Also resorbiert %	—	**64,2**	**29,0**	**30,2**	**25,0**	**29,6**	**48,8**	**75,2**	—	—

Bemerkenswert ist eine starke Verdauungsdepression des Rohproteins, während die stickstofffreien Nährstoffe normal resorbiert wurden (siehe auch Seite 331).

Periode II. Harnstoff.

Versuchsdauer: 19 Tage (vom 14. August bis 2. September 1920). Versuchstier: Hammel Nr. 2. Die Vorfütterung dauerte 9 Tage, der Hauptversuch 10 Tage. Das Tier verzehrte täglich:

	585,4 g Heu	mit 518,40 g Trockensubstanz und	6,61 g N
	1286,5 g eingesäuerte, gedämpfte Kartoffeln	„ 322,10 g „ „	4,58 g N
	15,0 g Harnstoff	„ 14,81 g „ „	6,93 g N
und	28,0 g Salze	Summe: 855,31 g Trockensubstanz und	18,12 g N

Tabelle IV.

Stickstoffbilanzen. Lebendgewichte, Kotgewichte, Harnmengen, Trinkwasser und Stalltemperaturen.

Datum	Stickstoffausscheidung						N-Ansatz		Gewicht des Tieres	Gewicht des frischen Kotes	Harnmengen	Trinkwasser	Stalltemperatur
	im Harn		im Kot		Summe								
1920	g	% der Zufuhr	g	% der Zufuhr	g	% der Zufuhr	g	% der Zufuhr	kg	g	ccm	ccm	° C
23./24. VIII.	10,54	58,2	7,39	40,8	17,93	99,0	0,19	1,0	44,9	889,0	3000	2000	18,0
24./25. VIII.	9,49	52,4	7,39	40,8	16,88	93,2	1,24	6,8	—	800,2	2000	2000	19,0
25./26. VIII.	9,92	54,7	7,39	40,8	17,31	95,5	0,81	4,5	—	768,2	2100	2000	18,5
26./27. VIII.	Harnverlust		7,39	40,8	—	—	—	—	44,1	839,2	—	2500	19,0
27./28. VIII.	8,56	47,3	7,39	40,8	15,95	88,1	2,17	11,9	—	751,0	3000	2500	17,5
28./29. VIII.	9,29	51,3	7,39	40,8	16,68	92,1	1,44	7,9	—	681,7	2700	3000	17,0
29./30. VIII.	6,64	36,7	7,39	40,8	14,03	77,5	4,09	22,5	44,3	736,7	2500	2000	17,0
30./31. VIII.	9,33	51,5	7,39	40,8	16,72	92,3	1,40	7,7	—	709,7	3300	3000	15,0
31. VIII./1. IX.	11,41	63,0	7,39	40,8	18,80	103,8	−0,68	−3,8	—	754,8	4000	2800	15,0
1./2. IX.	9,08	50,1	7,39	40,8	16,47	90,8	1,65	9,1	44,1	757,6	3200	2900	15,5
Im Mittel . .	9,36	51,7	7,39	40,8	16,75	92,5	1,37	7,5	44,4	768,8	2867	2470	17,2

Das Rohprotein wurde also zu 59,2% resorbiert. Der Hammel befindet sich im Stickstoffgleichgewicht. Die täglich retinierten 1,37 g N decken ungefähr den Zuwachs an Wolle und an anderen Epidermoidalgebilden. Ein Fleischansatz war nicht zu erwarten, weil es sich um ein ausgewachsenes Tier handelt. Pro Kilo Lebendgewicht und Tag erhielt das Tier 0,408 g Stickstoff bezw. 0,242 g resorbierbaren Stickstoff*). Die tägliche Gewichtsabnahme betrug im Mittel 80 g.

*) — 1,51 g resorbierbares Rohprotein.

Der in der vorliegenden Periode II produzierte Kot wog im Mittel pro Tag lufttrocken 361,2 g

Trockensubstanz	Asche	Organische Substanz	Rohprotein	Reineiweiß	Amide	Rohfett	Rohfaser	N-freie Extraktstoffe
93,85%	16,66%	77,19%	12,79%	8,77%	4,02%	3,67%	22,11%	38,62%

Hieraus ergibt sich der folgende Gehalt an Einzelbestandteilen in Gramm pro Tag:

Lufttrockener Kot	Trockensubstanz	Asche	Organische Substanz	Rohprotein	Reineiweiß	Amide	Rohfett	Rohfaser	N-freie Extraktstoffe
361,2 g	339,0 g	60,18 g	278,82 g	46,20 g	31,68 g	14,52 g	13,26 g	79,86 g	139,50 g

Die folgende Tabelle enthält die Verdauungswerte für die Nährstoffe des in der vorliegenden Periode II verzehrten Futters.

Tabelle V.

	Trockensubstanz g	Organische Substanz g	Rohprotein g	Reineiweiß g	Amide g	Rohfett g	Rohfaser g	N-freie Extraktstoffe g	Stärkewert pro Kopf kg	Stärkewert pro 1000 kg Lebendgew. kg
1585,4 g Heu	518,40	486,50	41,28	36,90	4,38	14,58	151,56	279,08	—	—
286,4 g eingesäuerte gedämpfte Kartoffeln abzügl. 28,54 g N-fr. Extraktstoffe	293,56	255,48	28,63	17,01	11,62	0,64	20,32	205,89	—	—
15,0 g Harnstoff	14,81	14,77	43,31*)	—	43,31	—	—	—	—	—
+ 28,54 g N-fr. Extraktstoffe aus den Kartoffeln	28,54	28,54								
28,0 g Salze (20 g $CaCO_3$, 3 g Na-Phosph. 3 g NaCl, 2 g K_2SO_4)	28,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Summe	883,31	785,29	113,22	53,91	59,31	15,22	171,88	484,97	—	—
Der Kot enthielt	339,00	278,82	46,20	31,68	14,52	13,26	79,86	139,50	—	—
Also resorbiert g	544,31	506,47	67,02	22,23	44,79	1,96	92,02	345,47	0,419	9,4
Also resorbiert %	—	**64,5**	**59,2**	**41,2**	**75,5**	**12,9**	**53,5**	**71,2**	—	—

Die Resorption der stickstoffreien Nährstoffe ist hiernach durch die **Harnstoff**gabe so gut wie unbeeinflußt geblieben, weil dieselben auch in der Grundfutterperiode I normal verdaut wurden, dagegen wurde die Verdauungsdepression des Rohproteins aufgehoben.

*) Harnstoffstickstoff · 6,25.

Tabelle VI. **Futterverzehr der Kuh Nr. 5 in Versuchsreihe A, Perioden I und III im Mittel pro Tag.**

Perioden I und III		Trokkensubstanz g	Asche g	Organ. Substanz g	Rohprotein g	Reineiweiß g	Amide g	Rohfett g	Rohfaser g	N-freie Extraktstoffe g	Stärkewert kg
6 kg Heu		5184,0	319,0	4865,0	412,8	369,0	43,8	145,8	1515.6	2790.8	
12,5 „ gedämpfte u. eingesäuerte Kartoffeln		3221,0	380,8	2840,2	286,3	170,1	116,2	6,4	203,2	2344.3	
160 g Salze		160,0	160,0	—	—	—	—	—	—	—	
Summe Rohnährstoffe		8565,0	859,8	7705,2	699,1	539,1	160,0	152,2	1718,8	5135.1	
Verdauungswerte %		—	—	64,2	29,0	30,2	25,0	29,6	48,8	75,2	
Verdaul. Nährstoffe g		—	—	4950,1	203,0	163,0	40,0	45,0	838.4	3863,7	4.12
Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	In Periode I (mittl. Gewicht der Kuh = 450,0 kg) =				0,45 kg	—	—	—	—	—	9.16
	In Periode III (mittl. Gewicht der Kuh = 425,7 kg) =				0,48 „	—	—	—	—	—	9,68
Im Mittel von Periode I und III = 0,465 kg											9,42

	Periode I	Periode III
Milchertrag pro Kopf und Tag =	10,99 kg	8,18 kg
„ „ 500 kg Lebendgewicht und Tag =	12,21 „	9,61 „

Milcherträge.

Versuchsreihe A. Periode I. Vom 4. bis 18. Mai 1920. Proteinärmeres Grundfutter (Heu + eingesäuerte Kartoffeln + Salze).

Tabelle VII. Erträge an Milch und Milchbestandteilen (Kuh Nr. 5).

Datum 1920	Milchmenge kg	Spezifisches Gewicht (15°)	Fett %	Fett g	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Fettfreie Trockensubstanz %	Fettfreie Trockensubstanz g	Gewicht der Kuh kg
4. V.	13,10				—	—	—	—	460
5. V.	13,00		—				—	—	—
6. V.	13,55		—		—		—	—	—
7. V.	13,45				—		—	—	—
8. V.	11,65						—	—	—
9. V.	11,10	—					—	—	—
10. V.	12,20			—			—	—	—
11. V.	11,55	1028,2	2,60	300,3	10,43	1204,7	7,83	904,4	450
12. V.	11,00	1028,7	2,52	277,2	10,46	1150,6	7,94	873,4	—
13. V.	11,20	1028,9	2,11	236,3	10,02	1122,2	7,91	885,9	—
14. V.	11,45	1028,1	2,60	297,7	10,40	1190,8	7,80	893,1	—
15. V.	9,65	1028,2	2,57	248,0	10,39	1002,6	7,82	754,6	—
16. V.	10,60	1028,0	2,50	265,0	10,26	1087,6	7,76	822,6	—
17. V.	11,50	1028,0	2,58	296,7	10,36	1191,4	7,78	894,7	—
18. V.	11,00	1027,9	2,75	302,5	10,53	1158,3	7,78	855,8	440
Im Mittel d. letzten 8 Tage:	10,99	1028,3	2,53	277,8	10,36	1138,5	7,83	860,7	Im Mittel der ganzen Periode 450

Infolge ungenügender Proteinzufuhr haben die Milcherträge fallende Tendenz bis etwa zum 7. Versuchstage. Vom 8. bis zum 15. Versuchstage zeigen die Tagesmilcherträge größere Übereinstimmung und sind deshalb bei der Berechnung der Mittelwerte allein berücksichtigt worden.

Versuchsreihe A. **Periode II. Vom 19. bis 28. Mai 1920. Hauptperiode (proteinärmeres Grundfutter + Harnstoff).**

Tabelle VIII.

Futterverzehr der Kuh Nr. 5 im Mittel pro Tag.

Periode II	Trockensubstanz g	Asche g	Organ. Substanz g	Rohprotein g	Reineiweiß g	Amide g	Rohfett g	Rohfaser g	N-freie Extraktstoffe g	Stärkewert kg
kg Heu	5184,0	319,0	4865,0	412,8	369,0	43,8	145,8	1515,6	2790,8	
2,5 kg gedämpfte u. eingesäuerte Kartoffeln abzüglich 285,4 g N-freier Extraktstoffe . .	2935,6	380,8	2554,8	286,3	170,1	116,2	6,4	203,2	2058,9	—
50 g Harnstoff und 285,4 g N-freie Extraktstoffe aus den Kartoffeln	{ 148,1 { 285,4	0,4 —	147,7 } 285,4 }	433,1	—	433,1	—	—	—	
80 g Salze	180,0	180,0	—	—	—	—	—	—	—	—
Summe Rohnährst.	8733,1	880,2	7852,9	1132,2	539,1	593,1	152,2	1718,8	4849,7	—
Verdauungswerte %	—	—	64,5	59,2	41,2	75,5	12,9	53,5	71,2	—
Verdaul. Nährstoffe g	—	—	5064,7	670,2	222,3	447,9	19,6	920,2	3454,7	4,19
Verdaul. Nährstoffe und Stärkewert pro 1000 kg Lebendgewicht u. Tag (mittleres Gewicht der Kuh 428,7 kg) . .	—	—	—	1,56 kg	—	—	—	—	—	9,77

Milchertrag pro Kopf und Tag . . . . 12,19 kg
" " 500 kg Lebendgewicht und Tag . . . . 14,22 "

Tabelle IX.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 5 in der Hauptperiode II (proteinärmeres Grundfutter + Harnstoff).

Datum 1920	Milchmenge kg	Spezif. Gewicht	Fett %	Fett g	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Fettfreie Trockensubstanz %	Fettfreie Trockensubstanz g	Gewicht der Kuh kg	Stalltemp. °C
19. V.	10,75	1028,4	2,20	236,5	10,00	1075,0	7,80	838,5	440	—
20. V.	11,25	1028,1	2,30	258,8	10,04	1129,5	7,74	870,7	—	—
21. V.	12,35	1028,0	2,45	302,6	10,20	1259,7	7,75	957,1	—	—
22. V.	12,95	1027,9	2,87	371,7	10,68	1383,1	7,81	1011,4	425	—
23. V.	12,75	1027,9	2,50	318,7	10,23	1304,3	7,73	985,6		—
24. V.	12,00	1028,1	2,70	324,0	10,52	1292,4	7,82	968,4	—	—
25. V.	12,35	1028,4	2,46	203,8	10,24	1264,6	7,78	960,8	—	—
26. V.	11,90	1028,4	2,40	285,6	10,24	1218,6	7,84	933,0	430	26,5
27. V.	11,75	1028,4	2,25	264,4	10,06	1182,1	7,81	917,7	—	22,0
28. V.	11,45	1028,4	2,61	398,8	10,49	1201,1	7,88	902,3	420	20,0
Mittel der letzten 8 Tage:	12,19	1028,3	2,53	308,7	10,36	1263,9	7,83	954,5	Im Mittel der ganzen Periode 428,7	—

Die Harnstoffzulage bewirkte somit eine schnelle Steigerung der Milchleistung, die vom 3. Versuchstage ab annähernd ihren Höhepunkt erreichte. Die beiden ersten Versuchstage bleiben bei der Mittelung der Milcherträge unberücksichtigt.

Versuchsreihe A. Periode III. Vom 29. Mai bis 7. Juni 1920. Proteinärmeres Grundfutter (Heu + eingesäuerte Kartoffeln + Salze).

Tabelle X.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen (Kuh Nr. 5).

Datum 1920	Milchmenge kg	Spezifisches Gewicht	Fett %	Fett g	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Fettfr. Trockensubstanz %	Fettfr. Trockensubstanz g	Gewicht der Kuh kg	Stalltemper. °C
29. V.	10,80	1027,7	2,20	237.6	9.82	1060.5	7.62	822,9	420	22,0
30. V.	10.25	1027.4	2.40	246.0	9.99	1024.0	7.59	778,0	-	21,0
31. V.	9,90	1027,8	2,09	206,9	9.72	962,3	7,63	755,4	-	20.0
1. VI.	9,75	1027,2	2.18	212.5	9.67	942.8	7.49	730.3	423	20,0
2. VI.	9.55	1027.4	2.20	210,1	9.75	931,1	7,55	721,0	—	19,0
3. VI.	8.80	1027,9	2,10	184.8	9,75	858,0	7.65	673,2	—	16.5
4. VI.	8.00	1027.6	2,57	205.6	10,24	819.2	7,67	613,6	—	16.5
5. VI.	8.05	1028.0	2.32	186,8	10,04	808.3	7,72	621,5	424	16.0
6. VI.	8.00	1028,3	2,10	168,0	9,85	788.0	7,75	620,0	—	15.5
7. VI.	8,05	1028.0	2.25	181,1	9.96	801,8	7,71	620,7	436	15.0
Mittel der letzten 5 Tage . .	8.18	1028.0	2,26	185.3	9,96	815,1	7.70	629,8	Im Mittel der ganz. Periode 425,7	—

Trotz Einstellung der Harnstofffütterung am 29. Mai hält die den Milchertrag steigernde Wirkung des Harnstoffs noch 5 Tage an. Streng genommen müßte das Plus an Milch und Milchbestandteilen, welches im Vergleich zu den Durchschnittswerten für die späteren Versuchstage der Periode III an den ersten 5 Tagen sezerniert worden ist, der Harnstoffperiode II nach Abzug der Mindererträge an den ersten beiden Versuchstagen noch zugerechnet werden: wir haben jedoch darauf verzichtet, also so ungünstig wie möglich für den Effekt der Harnstoffzufuhr auf die Milchsekretion gerechnet. Würden wir die Nachwirkung des Harnstoffs in Ansatz gebracht haben, so wäre der durch die Harnstoffzulage bewirkte Mehrertrag an Milch von 2.51 auf 3,21 kg zu erhöhen. bzw. es wären durch die Verfütterung von 1 kg Harnstoff 21,4 kg Milch gewonnen worden.

Um die Milcherträge aus den Zulagen zu ermitteln, sind zunächst die auf das gereichte Grundfutter in den Hauptperioden entfallenden Erträge an Milch und Milchbestandteilen zu bestimmen. Die Berechnung dieses Grundfutteranteils an den Erträgen in der Hauptperiode II erfolgte in der nachstehenden Weise:

Unter der Voraussetzung, daß von jeder Periode nur die für die Berechnung der Durchschnittswerte benutzten späteren Versuchstage berücksichtigt werden, liegt die Mitte der I. Periode zwischen dem 11. und 12. Versuchstage, die Mitte der Periode II zwischen dem 6. und 7. Versuchstage, die Mitte der Periode III in der Mitte des 8. Versuchstages. Der Gesamtunterschied von Mitte I bis Mitte III beträgt danach 21,5 Tage, der Unterschied von Mitte I bis Mitte II 10 Tage = 46,5% des Gesamtunterschiedes. Ermittelt man also die Differenzen der Durchschnittswerte für die Einzelbestandteile in den Perioden I und III und subtrahiert 46,5% dieser Differenzen von den Zahlen der Periode I, so erhält man die der oben bezeichneten Mitte der Periode II entsprechenden durchschnittlichen Erträge aus dem Grundfutter. Diese Methode ist etwas genauer, als wenn wir einfach die arithmetischen Mittel aus den Grundfutterperioden berechnet und mit den Mittelwerten der zugehörigen Hauptperioden verglichen hätten. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den nach beiden Methoden berechneten Werten ergibt sich nicht.

Tabelle XI. Durchschnittliche Erträge an Milch und Milchbestandteilen in den Perioden I—III (Versuchsreihe A) mit proteinärmerer Ernährung bei der Kuh Nr. 5.

Bezeichnung der Periode	Milchmenge im Mittel pro Tag kg	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Asche %	Asche g	Organische Substanz %	Organische Substanz g	Protein (N · 6,25) %	Protein (N · 6,25) g	Fett %	Fett g	Milchzucker u. a. N-freie Stoffe %	Milchzucker u. a. N-freie Stoffe g
I. Proteinärmeres Grundfutter (Heu + gedämpfte und eingesäuerte Kartoffeln)	10,99	10,36	1138,5	0,69	76,0	9,67	1062,5	2,19	240,7	2,53	277,8	4,95	544,0
II. Proteinärmeres Grundfutter + Harnstoff	12,19	10,36	1263,2	0,64	77,8	9,72	1185,4	2,29	279,1	2,53	308,7	4,90	597,6
III. Proteinärmeres Grundfutter	8,18	9,96	815,1	0,63	51,3	9,33	763,8	2,06	168,5	2,26	185,3	5,01	410,0
Erträge an Milch und Milchbestandteilen aus dem Grundfutter in der Hauptperiode II.													
	9,68	10,21	988,1	0,67	64,5	9,54	923,6	2,14	207,1	2,43	234,8	4,97	481,7

Die Besprechung der vorstehenden Versuchsergebnisse erfolgt im Zusammenhang mit dem zweiten Teil der Versuchsreihe auf Seite 336.

Tabelle XII. Futterverzehr der Kuh Nr. 5 in Versuchsreihe A, Perioden IV und VI, im Mittel pro Tag.

Perioden IV und VI	Trockensubstanz g	Asche g	Organische Substanz g	Rohprotein g	Reineiweiß g	Amide g	Rohfett g	Rohfaser g	N-freie Extraktstoffe g	Stärkewert kg
6 kg Heu	5184,0	319,0	4865,0	412,8	369,0	43,8	145,8	1515,6	2790,8	—
12,5 kg gedämpfte u. eingesäuerte Kartoff.	3221,0	380,0	2840,2	286,3	170,1	116,2	6,4	203,2	2344,3	—
160 g Salze	160,0	160,0	—	—	—	—	—	—	—	—
Summe	8565,0	859,8	7705,2	699,1	539,1	160,0	152,2	1718,8	5135,1	—
Verdauungswerte %	—	—	65,5	43,2	41,2	49,9	29,6	48,8	75,2	—
Verdauliche Nährstoffe g	—	—	5047,6	302,1	222,3	79,8	45,0	838,8	3861,7	4,19
1,0 kg Malzkeime	782,6	65,7	716,9	247,3	185,6	61,7	10,0	139,0	320,6	—
Verdauungswerte %	—	—	72	80	73	100	71	55	73	—
Verdauliche Nährstoffe g	—	—	515,4	197,8	136,1	61,7	7,1	76,5	234,0	0,384
Rohnährstoffe insgesamt	9347,6	925,5	8422,1	946,4	724,7	221,7	162,1	1857,8	5455,7	—
Verdauliche Nährstoffe insgesamt	—	—	5563,0	499,9	358,4	141,5	52,1	915,3	4095,7	4,574

Verdaul. Nährstoffe u. Stärkewert p. 1000 kg Lebendgewicht u. Tag:
In Periode IV (Mittl. Gew. d. Kuh = 423,2 kg) = 1,18 kg . . . . . 10,81 kg
„ „ VI („ „ „ „ = 415,0 kg) = 1,21 kg . . . . . 11,02 kg
Im Mittel von Periode IV und VI: 1,20 kg . . . . . 10,91 kg

	Periode IV	Periode VI
Milchertrag pro Kopf und Tag: =	8,46 kg	7,41 kg
„ „ 500 kg Lebendgewicht und Tag =	9,99 kg	8,93 kg

Perioden IV—VI. Proteinreichere Ernährung. Kuh Nr. 5.

Zu der Berechnung der verdaulichen Nährstoffe für die Perioden IV und VI ist folgendes zu bemerken:

Für die stickstoffreien Nährstoffe in Kartoffeln und Heu wurden die in dem Bilanzversuch an dem Hammel Nr. 2 direkt ermittelten Verdauungswerte eingesetzt, weil ihre Verdaulichkeit auch bei stickstoffarmer Ernährung nach den Bilanzversuchen an dem Hammel gleich blieb. Für das Protein war das nicht angängig; bei ausschließlicher Ernährung mit Kartoffeln und Heu bestand, wie wir sahen, eine starke Verdauungsdepression des Rohproteins. Durch Zulage von stickstoffhaltigen Nährstoffen wird die Verdauungsdepression behoben, wie wir z. B. in der Harnstoffperiode beobachteten. In den vorliegenden Perioden IV—VI war die Rohproteinzufuhr durch die Malzkeimzulage auch in den Grundfutterperioden eine höhere als in den Perioden I u. III, und eine Minderverdauung des Proteins war daher jedenfalls nicht vorhanden. Die Verdauungswerte für das Protein im Heu und in den Kartoffeln haben wir aus der Harnstoffperiode II berechnet, in der keine Verdauungsdepression bestand. Bei einer Resorbierbarkeit des Harnstoffstickstoffs von rund 85% ergibt sich für das Heu- und Kartoffelrohprotein zusammen aus der Harnstoffperiode II eine Resorbierbarkeit von 43,2%, mit der wir im zweiten Teil der Versuchsreihe gerechnet haben. Für die Malzkeime wurden die durchschnittlichen Verdauungswerte für sämtliche Nährstoffe nach den *Kellner*schen Tabellen eingesetzt. Wir lassen nunmehr die Daten für den zweiten Teil der Versuchsreihe A mit proteinreicherer Ernährung folgen (s. S. 337).

Sowohl bei proteinärmerer (Perioden I—III) als auch bei proteinreicherer Ernährung (Perioden IV—VI) haben hiernach die Harnstoffgaben die Erträge an Milch und Milchbestandteilen stark erhöht. Bei eiweißärmerer Ernährung war natürlich der Effekt des Harnstoffs auf die Milchleistung weit höher als bei einem höheren Proteingehalt des Futters.

Die aus 1 kg Harnstoff erzielten Mehrerträge an Milch und Milchbestandteilen waren:

	Milchmenge	Trockensubstanz	Fett	Protein	Milchzucker und andere N-freie organ. Stoffe
	kg	g	g	g	g
bei proteinärmerer Fütterung	16,73	1834,0	492,7	480,0	772,6
bei proteinreicherer Fütterung	9,53	1188,7	352,0	312,7	486,0

Nach den Bilanzversuchen an einem Hammel konnte das in der Harnstoffperiode II gegenüber den Grundfutterperioden I und III mehr

Fortsetzung auf S. 342.

Versuchsreihe A. Periode IV. Vom 8. bis 18. Juni 1920. **Proteinreicheres Grundfutter (Heu + gedämpfte und eingesäuerte Kartoffeln + Malzkeime + Salze).**

Tabelle XIII. Erträge an Milch und Milchbestandteilen (Kuh Nr. 5).

Zeit	Milchmenge	Spezifisches Gewicht	Fett		Trockensubstanz		Fettfreie Trockensubstanz		Gewicht der Kuh	Stalltemperaturen
1920	kg		%	g	%	g	%	g	kg	° C.
8. VI.	7,65*)	—	—	—	—	—	—	—	437	16,0
9. VI.	8,60*)	1028,6	2,25	—	10,11	—	7,86	—	—	16,0
10. VI.	9,40	—	—		—	—	—	—	—	16,5
11. VI.	8,55	1028,2	2,42	—	10,21	—	7,79		—	18,5
12. VI.	8,90	—	—	—	—	—	—	—	416	19,5
13. VI.	8,20	1027,8	2,55	209,1	10,21	837,2	7,66	628,1	—	20,0
14. VI.	9,30	1028,4	2,40	223,2	10,24	952,3	7,84	729,1		20,0
15. VI.	8,60	1027,6	2,53	217,6	10,19	876,3	7,66	658,7	420	20,5
16. VI.	8,55	1027,9	2,50	213,8	10,18	870,4	7,68	656,6	—	21,0
17. VI.	8,30	1028,0	2,27	188,4	9,98	828,3	7,71	639,9	—	21,5
18. VI.	7,80	1028,1	2,53	197,3	10,32	804,9	7,79	607,6	420	19,5
Mittel der letzten 6 Tage:	8,46	1027,9	2,46	208,2	10,18	861,5	7,72	653,3	Im Mittel der ganz. Period. 423,2	

Vom 6. Versuchstage an waren die Erträge an Milch und Milchbestandteilen einigermaßen gleichmäßig. Für die Berechnung der Mittelwerte wurden daher nur der 6. bis 11. Versuchstag berücksichtigt.

*) Am 8. und 9. VI. hatte die Malzkeimzulage 2 kg, vom 10. VI. ab 1 kg pro Tag betragen.

Versuchsreihe A. Periode V. Vom 19.—28. VI. 1920. Hauptperiode (proteinreicheres Grundfutter + Harnstoff).

Tabelle XIV.

Futterverzehr der Kuh Nr. 5 im Mittel pro Tag

Periode V	Trocken-substanz g	Asche g	Organische Substanz g	Rohprotein g	Reineiweiß g	Amide g	Rohfett g	Rohfaser g	N-freie Extraktstoffe g	Stärkewert kg
6 kg Heu	5184,0	319,0	4865,0	412,8	369,0	43,8	145,8	1515,6	2790,8	
12,5 „ gedämpfte und eingesäuerte Kartoffeln abzüglich 285,4 g N-freier Extraktstoffe	2935,6	380,8	2554,8	286,3	170,1	116,2	6,4	203,2	2058,9	
150 g Harnstoff + . . .	148,1	0,4	147,7							
285,4 g N-freier Extraktstoffe aus den Kartoffeln	285,4	—	285,4	433,1	—	433,1	—		—	
180 g Salze	180,0	180,0	—	—	—		—			
Summa	8733,1	880,2	7852,9	1132,2	539,1	593,1	152,2	1718,8	4849,7	—
Verdauungswerte . . . %	—	—	64,5	59,2	41,2	75,5	12,9	53,5	71,2	—
Verdauliche Nährstoffe . g	—	—	5064,7	670,2	222,3	447,9	19,6	920,2	3454,7	4.19
1 kg Malzkeime	782,6	65,7	716,9	247,3	185,6	61,7	10,0	139,0	320,6	
Verdauungsw. (Kellner) %	—	—	72	80	73	100	71	55	73	
Verdauliche Nährstoffe . g	—	—	515,4	197,8	136,1	61,7	7,1	76,5	234,0	0,384
Rohnährstoffe insgesamt .	9515,7	945,9	8569,8	1379,5	724,7	654,8	162,2	1857,8	5170,3	—
Verdauliche Nährstoffe insgesamt	—	—	5580,1	868,0	358,4	509,6	26,7	996,7	3688,7	4,574

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag (mittleres Gewicht der Kuh 418,5 kg) 2,10 kg . . . . 11,06 kg

Milchertrag pro Kopf und Tag . . . . 9,38 kg,
„ „ 500 kg Lebendgewicht und Tag 11,34 kg.

Tabelle XV.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 5, in der Hauptperiode V (Proteinreicheres Grundfutter + Harnstoff).

Tag 1920	Milchmenge kg	Spezifisches Gewicht	Fett %	Fett g	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Fettfr. Trockensubstanz %	Fettfr. Trockensubstanz g	Gewicht der Kuh kg	Stalltemp. °C
19. VI.	7,85	1028,4	2,40	188,4	10,24	803,8	7,84	615,4	420	20,5
20. VI.	7,65	1029,7	2,60	198,9	10,81	827,0	8,21	628,1	—	21,0
21. VI.	9,20	1029,0	2,50	230,0	10,51	966,9	8,01	736,9	—	20,5
22. VI.	9,05	1028,6	2,72	246,2	10,67	965,6	7,95	719,4	405	20,5
23. VI.	9,50	1027,8	2,80	266,0	10,57	1004,1	7,77	738,1	—	20,5
24. VI.	9,10	1028,6	2,66	242,1	10,60	964,6	7,94	722,5	—	20,0
25. VI.	9,70	1029,2	2,40	232,8	10,44	1012,7	8,04	779,9	419	19,5
26. VI.	9,20	1029,0	2,51	230,9	10,52	967,8	8,01	736,9	—	19,0
27. VI.	9,60	1028,7	2,49	239,0	10,42	1000,3	7,93	761,3	—	19,0
28. VI.	9,70	1028,6	2,40	232,8	10,29	998,1	7,89	765,3	410	21,0
Mittel der letzten 8 Tage:	9,38	1028,7	2,56	240,0	10,50	985,0	7,94	745,0	Im Mittel d. ganzen Periode 413,5	

Vom dritten Versuchstage ab tritt die Wirkung des Harnstoffs voll in Erscheinung, wir haben daher den 3. bis 10. Tag zur Berechnung der Mittelwerte benutzt.

Versuchsreihe A. Periode VI. Vom 29. Juni bis 6. Juli 1920. Kuh Nr. 5. Proteinreicheres Grundfutter (Heu + gedämpfte und eingesäuerte Kartoffeln + Malzkeime + Salze).

Tabelle XVI.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen.

Tag 1920	Milchmenge kg	Spezifisches Gewicht	Fett %	Fett g	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Fettfr. Trockensubstanz %	Fettfr. Trockensubstanz g	Gewicht der Kuh kg	Stalltemp. °C
29. VI.	9,75	1028,6	2,23	217,4	10,14	988,6	7,91	771,2	410	22,0
30. VI.	8,25	1028,5	2,30	189,7	10,14	836,5	7,84	646,8	—	22,5
1. VII.	8,30	1028,4	2,18	180,9	9,98	828,3	7,80	647,4	—	23,0
2. VII.	7,75	1028,8	2,28	176,7	10,20	790,5	7,92	613,8	410	23,0
3. VII.	6,95	1028,9	2,22	154,3	10,15	705,4	7,93	551,1	—	23,0
4. VII.	7,10	1028,9	2.21	157,0	10,14	720,0	7,93	563,0	—	21,5
5. VII.	7,65	1028,3	2,32	177,5	10,12	774,2	7,80	596,7	420	23,0
6. VII.	7,60	1028,6	2,10	159,6	9,93	754,7	7,83	595,1	420	22,0
Mittel der letzten 5 Tage:	7,41	1028,7	2,23	165.0	10,11	748,9	7,88	583,9	Im Mittel d. ganzen Periode 415	

Auch hier hielt in Übereinstimmung mit der Periode III die Steigerung der Milchsekretion durch die Harnstoffzufuhr noch einige Tage nach Fortfall der Harnstoffgabe an; wir haben ebenfalls auf eine Anrechnung derselben verzichtet (siehe dazu Seite 334).

Tabelle XVII.

Durchschnittliche Erträge an Milch und Milchbestandteilen in den Perioden IV bis VI, Kuh Nr. 5 (Versuchsreihe A) mit proteinreicherer Ernährung.

Periode	Milchmenge	Trockensubstanz		Asche		Organische Substanz		Protein (N · 6,25)		Fett		Milchzucker u. andere N-freie organ. Stoffe	
	kg	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g
IV. Proteinreicheres Grundfutter (Heu + gedämpfte und eingesäuerte Kartoffeln + Malzkeime)	8,46	10,18	861,5	0,66	55,7	9,52	805,8	2,14	181,0	2,46	208,2	4,92	416,6
V. Proteinreicheres Grundfutter + Harnstoff	9,38	10,50	985,0	0,61	57,4	9,89	927,6	2,39	224,2	2,56	240,0	4,94	463,4
VI. Proteinreicheres Grundfutter	7,41	10,11	748,9	0,63	47,0	9,48	701,9	2,34	173,4	2,23	165,0	4,91	363,5
Erträge an Milch und Milchbestandteilen *aus dem Grundfutter**) in der Hauptperiode V.	7,95	10,15	806,7	0,65	51,7	9,50	755,0	2,23	177,3	2,36	187,2	4,91	390,5

Die wichtigsten Ergebnisse aus beiden Teilen der Versuchsreihe A, Milcherträge und Gewichtsveränderungen enthalten die Tabellen XVIII bis XX.

*) Über die Berechnung vgl. Seite 334. Der Abstand der Mitten der Perioden IV und VI beträgt hier 18,5 Tage, derjenige der Mitten von IV und V 9 Tage = 48,6% der ersteren.

Tabelle XVIII.

Mehrertrag an Milch und Milchbestandteilen durch die Harnstoffzulage zu einem protein*ärmeren* Grundfutter in Periode II, Kuh Nr. 5.

Milchertrag aus	Milchmenge	Trockensubstanz		Asche		Organische Substanz		Protein		Fett		Milchzuck. u. andere N-frei. Stoff.	
	kg	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g
Grundfutter + Harnstoff	12,19	10,36	1263,2	0,64	77,8	9,72	1185,4	2,29	279,1	2,53	308,7	4,90	597,6
Grundfutter allein	9,68	10,21	988,1	0,67	64,5	9,54	923,6	2,14	207,1	2,43	234,8	4,97	481,7
Aus 150 g Harnstoff	2,51	10,96	275,1	0,53	13,3	10,43	261,8	2,87	72,0	2,94	73,9	4,62	115,9
Aus 1 kg Harnstoff	16,73	1834,0 g		88,7 g		1745,3 g		480,0 g		492,7 g		772,6 g	

Nach rechnerischer Ausschaltung des Einflusses der Lactation:

	kg	g	g	g	g	g	g
Grundfutter + Harnstoff	13,84	1455,4	91,7	1363,7	324,4	365,2	674,1
Grundfutter allein	10,99	1138,5	76,0	1062,5	240,7	277,8	544,0
Aus 150 g Harnstoff	2,85	316,9	15,7	301,2	[illegible]	[illegible]	130,1
Aus 1 kg Harnstoff	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

Tabelle XIX.

Mehrertrag an Milch und Milchbestandteilen durch die Harnstoffzulage zu einem protein*reicheren* Grundfutter in Periode V, Kuh Nr. 5.

Milchertrag aus	Milchmenge	Trocken-substanz		Asche		Organische Substanz		Protein		Fett		Milchzucker und andere N-freie Stoff.	
		%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g
Grundfutter + Harnstoff	9,38	10,50	985,0	0,61	57,4	9,89	927,6	2,39	224,2	2,56	240,0	4,94	463,4
Grundfutter allein	7,95	10,15	806,7	0,65	51,7	9,50	755,0	2,23	177,3	2,36	187,2	4,91	390,5
Aus 150 g Harnstoff	1,43	12,47	178,3	0,40	5,7	12,07	172,6	3,28	46,9	3,69	52,8	5,10	72,9
Aus 1 kg Harnstoff	9,53	1188,7 g		38,00 g		1150,7 g		312,7 g		352,0 g		486,0 g	

Nach rechnerischer Ausschaltung des Einflusses der Lactation.

	kg	g	g	g	g	g	g
Grundfutter + Harnstoff	9,98	1051,9	61,8	990,1	228,9	266,9	494,3
Grundfutter allein	8,46	861,5	55,7	805,8	181,0	208,2	416,6
Aus 150 g Harnstoff	1,52	190,4	6,1	184,3	47,9	58,7	77,7
Aus 1 kg Harnstoff	10,13	1269,3	40,7	1228,6	319,3	391,3	518,0

Tabelle XX.

Gewichtsveränderungen der Kuh Nr. 5 während der 6 Perioden in der Versuchsreihe A.

Periode	Dauer in Tagen	Anfangs-gewicht kg	Endgewicht kg	Anzahl der Wägungen	Durchschnitts-gewicht aus allen Wägungen kg	Tägliche Gewichtszunahme (+) oder -Abnahme (−). kg
Heu + gedämpfte u. eingesäuerte Kartoff.	15	460	440	3	450,0	−**1,33**
I. Heu + gedämpfte und eingesäuerte Kartoffeln + Harnstoff	10	440	420	4	428,7	−**2,00**
II. Heu + gedämpfte u. eingesäuerte Kartoff.	10	420	436	4	425,7	+**1,60**
V. Heu + gedämpfte und eingesäuerte Kartoffeln + Malzkeime	11	437	420	4	423,2	−**1,55**
. Heu + gedämpfte und eingesäuerte Kartoffeln + Malzkeime + Harnstoff	10	420	410	4	413,5	−**1,00**
I. Heu + gedämpfte und eingesäuerte Kartoffeln + Malzkeime	8	410	420	4	415,0	+**1,25**

gebildete Milcheiweiß aus dem mehr resorbierten Protein des Grundfutters stammen. Dieses Plus an Milchprotein betrug in der Harnstoffperiode im Mittel pro Tag 72,0 g. Das infolge Beseitigung der Verdauungsdepression durch Harnstoffzufuhr mehr resorbierte Eiweiß aus Kartoffeln und Heu betrug 89,1 g[1]).

Hiernach könnte das mehr produzierte Milcheiweiß aus dem Protein des Grundfutters gedeckt worden sein. Es ist natürlich für den Erfolg, wenn auch nicht für die Theorie, gleichgültig, ob der Harnstoff direkt oder indirekt als Quelle der Milchbildung in Betracht käme. Übrigens kann es sich stets nur um eine indirekte Verwertung des Harnstoffstickstoffs handeln, auch dann, wenn derselbe im Milcheiweiß wieder erscheint, weil das nur dadurch möglich ist, daß der Harnstoff zuvor zu Bakterieneiweiß synthetisiert worden war. Ebenso kann die Verwendung des Harnstoffs zur Fleischbildung nur nach seinem Aufbau zu Bakterieneiweiß erfolgen. Bei den erwähnten Versuchen an Lämmern (l. c.) enthielt das Futter kein resorbierbares Eiweiß, und andererseits wissen wir, daß eine einzelne Aminosäure oder ein Amid allein von tierischen Zellen nicht zu arteigenem Eiweiß aufgebaut zu werden vermag.

Für die Perioden IV—VI kam die letztgenannte Art der Harnstoffverwertung (Synthese zu Bakterieneiweiß) in Betracht, weil eine Verdauungsdepression des Futtereiweißes infolge der Zulage von proteinreichen Malzkeimen nicht bestanden haben dürfte.

Nach der vorstehenden Tabelle XX hatte die Kuh nicht unerhebliche Gewichtsverluste, die in der ersten Harnstoffperiode II täglich 2 kg, in der zweiten Harnstoffperiode V pro Tag 1 kg betrugen. Die Kuh war, als sie kalbte, ziemlich fett, und man wird bei frischmilchenden Kühen zu Beginn der Lactation zumeist Gewichtsverminderungen feststellen. Im vorliegenden Fall war in den Grundfutterperioden I u. III die Zufuhr an verdaulichem Rohprotein mit 0,47 kg pro 1000 kg Lebendgewicht überdies unzureichend. Auch der Stärkewert der Rationen war mit 9,4 kg recht knapp bemessen. *Kellner* fordert bei einem Milchertrag von 10 kg pro 500 kg Lebendgewicht und Tag 1,5—2,0 kg verdauliches Rohprotein und 10—11 kg Stärkewert. In den Grundfutterperioden IV und VI reicht der Stärkewert der Ration mit 11,0 kg zwar aus, der Gehalt an verdaulichem Rohprotein erreicht aber mit 1,2 kg noch nicht den von *Kellner* geforderten Wert. In der Harnstoffperiode II war die Nährstoffzufuhr im Vergleich zu der produzierten Milchmenge von rund 14 kg ebenfalls ungenügend und nur in der zweiten Harnstoffperiode V wurde die erforderliche Menge an verdaulichem Rohprotein und Stärke-

[1]) Es wurden resorbiert in den Grundfutterperioden I und III 203,0 g, in der Harnstoffperiode II 670,2 g, darunter 378,1 g aus dem Harnstoff gebildetes Protein. Es restieren somit aus dem Grundfutter der Periode II 292,1—203,0 = 89,1 g verdauliches Rohprotein.

wert gereicht. In den Perioden I und III hat die Kuh für die Milchbildung sicher zum Teil Eiweiß aus ihrem Körperbestande mit in Anspruch nehmen müssen, das in der Harnstoffperiode wahrscheinlich wieder aus der erhöhten Stickstoffzufuhr ersetzt wurde. Die Gewichtsveränderungen können aus bekannten Gründen beim Wiederkäuer nur sehr wenig über die Beteiligung von Körperbestandteilen an denselben beweisen. Das geht z. B. aus einem Vergleich der Perioden III und IV hervor; in der Grundfutterperiode III nahm das Tier trotz geringerer Nahrungszufuhr täglich im Durchschnitt 1,6 kg an Körpergewicht zu, in der Grundfutterperiode IV wurde dagegen trotz eines höheren Nährstoffgehaltes der Tagesgaben eine Verminderung um denselben Wert (1,6 kg pro Tag) beobachtet. Sicher ist, daß die Kuh während des Versuches etwas magerer wurde und somit das Fett bis zu einem gewissen Grade bei den Gewichtsabnahmen beteiligt ist. Was die Hauptperioden mit Harnstoff betrifft, so ist es sehr wahrscheinlich, daß ein Bruchteil des verzehrten Harnstoffs nicht zu Bakterieneiweiß synthetisiert sondern als solcher resorbiert wurde. Harnstoff ist ein Diureticum, und es könnten somit die Gewichtsabnahmen durch eine vermehrte Harnsekretion erklärt sein. Im übrigen ist es sowohl durch die mitgeteilten Bilanzversuche an Schafen, wie durch die späteren an einer Milchkuh erwiesen, daß der Harnstoff in Rationen für Wiederkäuer den stickstoffhaltigen Nährstoffen zugezählt werden muß. Die Annahme, daß die Gewichtsabnahme der Kühe während der Harnstoffperioden nicht auf eine Steigerung des Stoffwechsels zurückgeführt werden kann, erhält eine weitere Stütze in der 3wöchigen Harnstoffperiode an den Kühen 3 und 4 in Versuchsreihe D. Hier nahmen die Kühe nicht unerheblich an Gewicht zu. Jedenfalls würde nichts zu der Annahme berechtigen, daß etwa der Harnstoff die Milchsekretion dadurch steigert, daß er als Reizstoff wirkt und den Abbau von Körpereiweiß erhöht. Wenn dem aber auch so wäre, was schon durch die erwähnten Bilanzversuche an Schafen und einer Kuh widerlegt ist, würde der Harnstoffütterung in Rationen für Milchtiere dennoch praktische Bedeutung zukommen. Die Verwertung der Nährstoffe für die Milchbildung ist bekanntlich bei verschiedenen Tieren, je nach deren Individualität, ihrem Lactationsstadium usw. außerordentlich großen Schwankungen unterworfen. Von den über den Erhaltungsbedarf hinaus verabreichten ausnutzbaren Nährstoffen findet man z. B. zwischen 20% und 80% in der Milch wieder, je nach der individuellen Fähigkeit der Kühe, wenig oder viel Milch zu produzieren. Wenn Harnstoffgaben bei schlechten Milcherinnen, bei denen der Überschuß an Nahrungseiweiß zu einfachen stickstoffhaltigen Harnbestandteilen abgebaut und durch die Nieren ausgeschieden wird, bewirken würden, daß ein entsprechend großer Anteil dieses Eiweißes und der andernfalls für den Fettansatz verwandten stickstoff-

freien Nährstoffe statt dessen für die Milchbildung ausgenutzt würde, so käme der Verfütterung von Harnstoff an schlechte Milchkühe doch große Bedeutung zu. Aus den späteren Versuchen (siehe besonders Versuchsreihe D) kann aber nur gefolgert werden, daß der Harnstoff in Kombination mit Kohlenhydraten auf dem Umwege über den Aufbau zu Bakterieneiweiß ebenso für die Milchbildung verwendet wird wie andere Proteine.

Versuche an den Kühen Nr. 1—4.

Die Versuchsanstellung in den Versuchsreihen B—D.

Für die nachstehend beschriebenen Versuche dienten 4 ältere Milchkühe, die frischmilchend eingestellt wurden, mit Ausnahme von Kuh Nr. 2, die hochtragend angekauft war und am 24. II. 1921 kalbte. Es war zunächst geplant gewesen, möglichst ausgeglichene, jüngere Kühe derselben Rasse, des gleichen Lactationsstadiums und mit gleichen Milcherträgen für die Versuche zu benutzen; es glückte uns im Dezember 1920 jedoch trotz der Bemühungen der Landwirtschaftskammer für die Provinz Brandenburg nicht, diese Bedingungen zu erfüllen. Immerhin befanden sich die am 16. XII. 1920 gekaufte Kuh Nr. 1 und die am 5. I. 1921 eingestellten Kühe Nr. 3 und 4 ungefähr im gleichen Lactationsstadium, sie hatten etwa 8 Tage vor dem Ankauf gekalbt. Die Kühe Nr. 1 und 3 waren gute Milcherinnen, die letztere ein Herdbuchtier. Die Kühe Nr. 1, 2 und 3 waren schwarzbuntes Niederungsvieh, Kuh Nr. 4 ein primitiveres Kreuzungsprodukt, das nur relativ geringe Milcherträge lieferte. Zunächst wurden die frischmilchende Kuh Nr. 1, die etwa 15 Liter, und die hochtragende Kuh Nr. 2, die etwa 7 Liter Milch lieferte, in den Versuch genommen. Leider erkrankte die Kuh Nr. 1 im Verlaufe desselben teils infolge einer vorübergehenden Verdauungsstörung, teils infolge der Entzündung einer vorderen Extremität und konnte erst wieder einige Zeit später als Versuchstier dienen, so daß die betreffende Versuchsreihe (B) nur mit der Kuh Nr. 2 durchgeführt werden konnte. Wir legten Wert darauf, solche Rationen als Grundfutter zu verabreichen, wie sie jetzt vielfach in der landwirtschaftlichen Praxis verfüttert werden. Infolge des großen Eiweißmangels erhalten die Kühe während der Stallfütterung oft nur Rauhfutter und Rüben. Wir beabsichtigten, Wiesenheu und Futterrüben als Grundfutter zu geben. Da letztere aber infolge der frühen Fröste zumeist erfroren und in einwandfreier Beschaffenheit nicht zu erhalten waren, wurden Zuckerrüben gekauft, die in den Monaten Januar—März (Versuchsreihen B u. C) nach Waschung und Schnitzelung den Tieren im Gemisch mit Heuhäcksel und Mineralstoffen vorgelegt wurden.

Für die Versuchsreihe D wurde ein Teil der ebenso vorbereiteten Zuckerrüben in wasserundurchlässigen Gruben eingesäuert und mit

Brettern, einem Lehmguß und einer stärkeren Sandschicht abgedeckt. Die Sauerfutterbereitung war in einwandfreier Weise gelungen. Das für die Versuchsreihen B—D verwandte Salzgemisch war zusammengesetzt aus:

37,04% $CaCO_3$
37,04% $NaCl$
18,52% Na_2HPO_4
7,40% K_2SO_4.

Die Tagesgaben an Salzen wurden dem verschiedenen Gewicht der Tiere entsprechend auf 106 bzw. 135 g bemessen.

Die Zusammensetzung der für die Versuchsreihen B und C benutzten Futtermittel ist in Tabelle XXI mitgeteilt. Die Analyse der in Versuchsreihe D neu hinzugekommenen Futtermittel siehe auf S. 379.

Tabelle XXI.

Zusammensetzung der Futtermittel für die Versuchsreihen B und C.

	Trockensubstanz %	Asche %	Organ. Substanz %	Rohprotein %	Reineiweiß %	Amide %	Rohfett %	Rohfaser %	N-freie Extraktstoffe %
Wiesenheu	100	7,09	92,91	8,72	7,94	0,78	1,96	30,40	51,83
Erdnußkuchen	90,43	6,10	84,33	51,03	46,25	4,78	5,90	3,78	23,62
				Stickstoff					
Harnstoff	99,94	0,04	99,90	46,61	—	99,90	—	—	—
				Rohprotein					
Zuckerrüben v. 23. XII. 20 bis 5. I. 21	24,45	1,04	23,41	1,46	0,85	0,61	0,03	1,15	20,77
Zuckerrüben v. 6.—20. I. 21	25,47	0,95	24,52	1,39	0,81	0,58	0,03	1,20	21,90
Zuckerrüben v. 21. I. bis 6. II. 21	25,48	1,01	24,47	1,44	0,84	0,60	0,03	1,20	21,80
Zuckerrüben v. 7.—16. II. 21	26,61	0,91	25,70	1,33	0,78	0,55	0,03	1,25	23,09
Zuckerrüben v. 17. II. bis 8. III. 21	26,76	0,86	25,90	1,42	0,83	0,59	0,03	1,26	23,19
Zuckerrüben v. 9. III. bis 16. III. 21	27,56	0,96	26,60	1,43	0,84	0,59	0,03	1,30	23,84

Die Beschaffung eines hochwertigen Wiesenheues, wie wir es für die Versuche wünschten, gelang uns, wie bereits erwähnt, ebenfalls nicht, wir mußten uns damit begnügen, ein allerdings gut geerntetes, aromatisches, aber ca. 50% Sauergräser und minderwertige Bestandteile enthaltendes, ziemlich nährstoffarmes Heu zu kaufen, das die Kühe nicht gerade gerne fraßen. Das Heu war nach der von Dr. *Duysen* von der Landwirtschaftlichen Hochschule ausgeführten botanischen Analyse folgendermaßen zusammengesetzt:

Berlin, den 23. XII. 1920.

Botanische Analyse einer am 17. XII. übersandten *Heuprobe*.

Ein aus der Probe ohne Wahl herausgenommenes Quantum setzt sich zusammen aus:

	g	%
I. Süße Gräser:		
Aira caespitosa	115	18,2
Glyceria aquatica	100	15,9
Phragmites communis	50	7,9
Festuca ovina	5	0,8
Calamagrostis epigeios, Holcus lanatus, Festuca pratensis, Cynosurus cristatus, Lolium italicum	30	4,8
II. Sauere Gräser:		
Carex spec.	250	39,7
III. Andere Bestandteile, die nur in ganz geringen Mengen sich vorfanden:		
Juncus bufenius	10	1,6
Cirsium palustre	10	1,6
Juncus conglomeratus, Juncus effusus, Rumex hydrolapathum, Glechoma hederacea, Lathyrus pratensis, Calla palustris, Triglochia palustris, Veronica officinalis, Equisetum limosum, Abgeblühte Dolden von Umbelliferen, aber ohne Früchte	60	9,5
	630	100,0

Das Heu ist nach seiner Zusammensetzung als Heu III. Güte zu bezeichnen. Schädliche Bestandteile sind in demselben nicht vorhanden.

gez. Dr. *F. Duysen.*

Durch die schlechte Beschaffenheit des Heues und die Notwendigkeit, die Rationen nicht ganz auf der normalen Höhe zu halten, um stets eine restlose Futteraufnahme zu bewirken, war es bedingt, daß die Kühe zum Teil nicht unerheblich an Lebendgewicht einbüßten. Hätten wir ein gutes Wiesenheu zur Verfügung gehabt, so wären Gewichtsverluste nicht eingetreten. Die Vorbereitung der Futtermittel erfolgte genau in derselben Weise, wie es für die Versuchsreihe A beschrieben wurde. Auch hier wurde das sämtliche Heu vor Beginn der Versuche gehäckselt, und es wurden fortlaufend Trockensubstanzbestimmungen ausgeführt, um stets die Aufnahme gleicher Trockensubstanzmengen zu gewährleisten. Ebenso wurde täglich ein bestimmter Prozentsatz der Durchschnittsprobe aus den Zuckerrüben gesammelt, getrocknet und nach Beendigung der Perioden analysiert. Im Verlaufe der Versuche wurden

mehrere vollständige Futtermittelanalysen der Rüben ausgeführt, im übrigen beschränkten wir uns auf die Asche-, Stickstoff- und Wasserbestimmung und setzten für Rohfett- und Rohfasergehalt die gleichen Prozentsätze der Rübentrockensubstanz ein, die in der letzten vollständigen Analyse ermittelt worden waren. Die verdaulichen Nährstoffe der verschiedenen Futtermittel wurden sowohl unter Benutzung der mittleren Verdauungswerte nach *Kellner* als auch durch Einsetzen der an der Kuh Nr. 4 direkt gefundenen Daten berechnet. Wir werden sehen, daß die durchschnittlichen Verdauungskoeffizienten nach den Futtertabellen zum Teil sehr stark von den direkt ermittelten abweichen, woraus zu folgern ist, daß man zu zuverlässigen Zahlen über den verdaulichen Anteil der Nährstoffe im speziellen Falle nur auf Grund von Stoffwechselversuchen gelangen kann. Einen kurzen Überblick über die in die Versuchsreihen B—D eingestellten Kühe, die Art der Fütterung und die Reihenfolge der Perioden lassen wir folgen.

Versuchsreihe B.

Wie erwähnt, konnte dieselbe nur an der Kuh Nr. 2 durchgeführt werden. Weil die Kuh hochtragend war, nur noch relativ geringe Milchmengen lieferte und bei dieser Versuchsreihe als Grundfutter außer Heu und Rüben 0,5 kg Erdnußkuchen gegeben wurde, konnte, wenn überhaupt, nur eine ganz geringe Wirkung des Harnstoffs auf die Milchsekretion erwartet werden. Die Versuchsreihe B zerfällt in 3 Perioden; in Periode I und III wurde das aus Heu, *frischen* Zuckerrüben und Erdnußkuchen bestehende Grundfutter gereicht, in der Periode II erhielt das Tier eine Harnstoffzulage.

Versuchsreihe C.

Diese Versuchsreihe wurde an den 3 Kühen Nr. 1, 3 und 4 durchgeführt. Sie setzt sich aus 6 Perioden zusammen; in Periode I, III und VI wurde ein eiweißarmes, aus Heu, *frischen* Zuckerrüben und Salzen bestehendes Grundfutter gegeben, in der Hauptperiode II erhielten die Kühe eine Harnstoffzulage, in der Hauptperiode IV eine Zulage von Zuckerrüben und Harnstoff und in der Hauptperiode V eine Zulage von Erdnußkuchen, deren Gehalt an verdaulichem Rohprotein und an Stärkewert mit der Rüben-Harnstoffzulage in der Periode IV nahezu übereinstimmte. Die Kühe Nr. 3 und 4 wurden für sämtliche 6 Perioden eingestellt, die Kuh Nr. 1 trat von der III. bis VI. Periode hinzu.

Versuchsreihe D.

Für die Versuchsreihe D wurden die Kühe Nr. 2, 3 und 4 eingestellt. Das Grundfutter bestand aus dem gleichen Wiesenheu und aus *eingesäuerten* Zuckerrüben nebst Salzen. Die Versuchsreihe umfaßte für die Kühe 2 und 3 je 5 Perioden, in Periode I und V wurde das Grundfutter verabreicht, in der Periode II erhielten die Kühe außerdem eine

Erdnußkuchenzulage, in der Periode III wurde der Erdnußkuchen durch Harnstoff und Kartoffelflocken mit dem gleichen Gehalt an verdaulichem Stickstoff und Stärkewert ersetzt, in der Periode IV wurden nur Grundfutter und Kartoffelflocken gereicht, während der Harnstoff fortgelassen wurde. Die Höhe der Gaben wurde ungefähr nach dem Lebendgewicht bemessen und betrug für die Kuh Nr. 3 rund 75% der Rationen für die Kuh Nr. 2. Sämtliche Feststellungen hinsichtlich des Futterverzehrs und der Milcherträge erfolgten für beide Kühe getrennt.

Die Kuh Nr. 4 diente für Bilanzversuche. Sie wurde mit einem zweckmäßig konstruierten Harntrichter und Kotbeutel ausgerüstet, der im Prinzip den Apparaten für Ziegen und weibliche Schafe entsprach, wie sie von dem einen von uns früher beschrieben worden sind[1]). Die Apparatur bewährte sich gut, es gelang fast stets, Kot und Harn quantitativ und getrennt voneinander zu erhalten. Der Urin wurde durch einen Gummischlauch in eine hinter und unter dem Stande befindliche Glasflasche geleitet, die mit einer zur Ansäuerung ausreichenden Salzsäuremenge beschickt war.

Es gelangten folgende Bilanzversuche an der Kuh Nr. 4 zur Durchführung:

Periode I . . Grundfutter,
Periode II . . Grundfutter + Erdnußkuchen,
Periode III . . Grundfutter + Harnstoff und Kartoffelflocken.

Versuchsreihe B an der Kuh Nr. 2.

Das Versuchstier befand sich während dieser aus 3 Perioden bestehenden Versuchsreihe in sehr vorgeschrittenem Lactationsstadium, nämlich zwischen dem 63. und 22. Tage vor dem Kalben. Ein stärkerer Effekt des Harnstoffes auf die Milchleistung war unter diesen Umständen von vornherein nicht zu erwarten. Wir haben daher im folgenden auf eine Wiedergabe der vorliegenden genauen analytischen Daten verzichtet und nur die notwendigsten Angaben gemacht. Die Tagesration bestand in den Grundfutterperioden I und III aus 7 kg Wiesenheu, 15 kg Zuckerrüben, 0,5 kg Erdnußkuchen und 135 g Salzgemisch, in der dazwischenliegenden Hauptperiode II wurden 200 g Harnstoff pro Tag zugelegt. An verdaulichen Nährstoffen verzehrte die Kuh in den Grundfutterperioden pro Tag 0,36 kg verdauliches Rohprotein und 4,31 kg Stärkewert, in der Harnstoffperiode II: 0,89 kg verdauliches Rohprotein und 4,31 kg Stärkewert.

An Milchmenge und Milchtrockensubstanz wurden im Mittel jeder Periode erzielt:

[1]) *W. Völtz*, Neue Apparate zur Kot- und Harngewinnung bei Stoffwechselversuchen. In *E. Abderhalden*, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, 1919. Näheres über die Stoffwechselapparatur für die Milchkuh siehe in der demnächst erscheinenden Neuauflage des Werkes.

	Milchmenge[1]) kg	Milchtrockensubstanz g
In Periode I (Grundfutter)	6,83	781,4
„ „ II (Grundfutter + Harnstoff) . .	6,78	790,0
„ „ III (Grundfutter)	5,68	673,0

Hiernach hätte der Harnstoff in der Periode II gegenüber der Grundfutterperiode I keinen Effekt geäußert; in Wirklichkeit haben aber, wie ein Vergleich der Grundfutterperioden I und III erweist, die Milcherträge eine stark fallende Tendenz, die Harnstoffgabe hat also den Abfall der Milchsekretion in der Periode II aufgehalten. Eine Gegenüberstellung der in der Harnstoffperiode erzielten Milcherträge mit den aus beiden Grundfutterperioden I und III ermittelten (vgl. S. 334) ergibt, daß aus 200 g Harnstoff 0,55 kg Milch und 64,7 g Milchtrockensubstanz bzw. aus 1 kg Harnstoff 2,75 kg Milch mit 323,5 g Trockensubstanz erzielt wurden. Das ist infolge der vorgeschrittenen Laktation kein starker, aber immerhin deutlicher Effekt; natürlich wäre unter solchen Bedingungen eine Harnstoffütterung nicht rentabel.

Versuchsreihe C.

Für diese Versuchsreihe wurden die Kühe 1, 3 und 4 eingestellt, die Kuh Nr. 1 allerdings erst von der III. Periode ab. Wir wollten hier den Einfluß des Harnstoffs allein und im Gemisch mit einem eiweißarmen und im Vergleich zu einem proteinreichen Futtermittel mit demselben Gehalt an resorbierbarem Stickstoff und Stärkewert bestimmen.

Als proteinreiches Kraftfuttermittel wurden 0,877 kg Erdnußkuchen verabreicht. Auf Grund der Futtermittelanalyse und der mittleren Verdauungswerte berechnen sich für die genannte Menge:

0,40 kg verdauliches Rohprotein und 0,66 kg Stärkewert.

An Zuckerrüben und Harnstoff mußten folgende Mengen verfüttert werden:

3,81 kg Zuckerrüben mit 0,03 kg verdaulichem Rohprotein und 0,66 kg Stärkewert und
0,15 kg Harnstoff, entspr. 0,37 kg verdaulichem Rohprotein.

Wir wählten folgende Versuchsanstellung:

Periode I Grundfutter (Wiesenheu + geschnitzelte Zuckerrüben + Salze),
„ II Grundfutter + Harnstoff,
„ III Grundfutter,
„ IV Grundfutter + Zuckerrüben + Harnstoff,
„ V Grundfutter + Erdnußkuchen,
„ VI Grundfutter.

Wir lassen die tabellarischen Zusammenstellungen bezüglich des Futterverzehrs, der Milcherträge und der sonstigen Feststellungen folgen.

[1]) Die vollständige Analyse siehe in der Tabelle CIII.

1. Die Versuche an den Kühen Nr. 3 und 4.

Versuchsreihe C. Periode I. Kuh Nr. 3 und 4. Grundfutter (Heu + Zuckerrüben + Salze). Vom 13./14.—22./23. I. 1921.

Tabelle XXII.

Futterverzehr der Kühe (mittleres Gewicht 383,0 kg) im Mittel pro Kopf und Tag.

Ration	Trocken-substanz kg	Asche kg	Organische Substanz kg	Rohprotein kg	Reineiweiß kg	Amide kg	Rohfett kg	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe kg
5,50 kg Wiesenheu	4,5810	0,3248	4,2562	0,3995	0.3637	0,0358	0,0898	1,3926	2,3743
11,8 kg Zuckerrüben	3,0055	0,1121	2,8934	0,1640	0,0956	0,0684	0,0034	0,1416	2,5844
Rohnährstoffe Summe	7,5865	0,4369	7,1496	0,5635	0,4593	0,1042	0,0932	1,5342	4,9587

Hierzu 106 g Salzgemisch.

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach den *Kellner*schen Tabellen.

In der Ration	Organ. Substanz		Rohprotein		Rohfett		Rohfaser		N-freie Extraktstoffe		Stärkewert in kg
	%	kg	%	kg	%	kg	%	kg	%	kg	
Wiesenheu	57	2,41	50	0,20	49	0,04	55	0,77	59	1,40	1,62
Zuckerrüben	92	2,65	55	0,09	—	—	34	0,05	97	2,51	1,98
Verdauliche Nährstoffe Summe	—	5,06	—	0,29	—	0,04	—	0,82	—	3,91	3,60
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag im Mittel	—	—	—	**0,76**	—	—	—	—	—	—	**9,40**

Mittlerer Milchertrag { pro Kopf (383,0 kg) und Tag 10,16 kg
„ 500 kg Lebendgewicht und Tag 13,26 kg

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach unseren Stoffwechselversuchen an der Kuh Nr. 4.

	Verdauliches Rohprotein	Stärkewert
Wiesenheu	0,06 kg	1,26
Zuckerrüben	0,09 kg	2,03
Summe	0,15 kg	3,29 kg
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	0,39 kg	8,59 kg
Nach dem Ausnutzungsversuch enthielt die Ration also in Prozenten der aus den *Kellner*schen Tabellen berechneten Werte nur	51,3%	91,4%

Tabelle XXIII.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von den Kühen Nr. 3 und Nr. 4 in der Grundfutterperiode I (Heu + Zuckerrüben + Salze).

Tag	Milchmenge			Spezifisches Gewicht	Fett		Trockensubstanz		Fettfreie Trockensubstanz		Gewicht		Stalltemperatur °C		
1921	Kuh 8 kg	Kuh 4 kg	Summe kg		%	g	%	g	%	g	Kuh 8 kg	Kuh 4 kg	Min.	Max.	Mittel
13./14. I.	13,29	9,02	22,31	1031,1	3,40	758,5	12,12	2704,0	8,72	1945,5	—	—	12,5	16,0	14,25
14./15. I.	13,35	8,88	22,23	1031,2	3,30	733,6	12,02	2672,0	8,72	1938,4	410	360	10,5	15,5	13,0
15./16. I.	13,80	8,36	22,16	1030,7	3,07	680,3	11,62	2575,0	8,55	1894,7	—	—	11,0	14,0	12,50
16./17. I.	12,57	8,34	20,91	1031,1	2,95	616,9	11,58	2421,4	8,63	1804,5	—	—	11,5	12,5	12,0
17./18. I.	11,91	8,20	20,11	1030,4	3,15	633,4	11,64	2340,8	8,49	1707,4	—	—	10,0	12,5	11,25
18./19. I.	11,24	7,95	19,19	1030,3	2,95	566,1	11,38	2183,8	8,43	1617,7	—	—	12,0	14,0	13,0
19./20. I.	12,75	8,43	21,18	1031,4	2,97	629,0	11,68	2473,8	8,71	1844,8	—	—	11,0	13,5	12,25
20./21. I.	12,69	7,96	20,65	1031,4	2,85	588,5	11,53	2381,0	8,68	1792,5	399	363	11,0	14,0	12,50
21. 22. I.	12,32	7,88	20,20	1030,8	2,86	577,7	11,40	2302,8	8,54	1725,1	—	—	11,0	15,0	13,0
22./23. I.	12,13	7,89	20,02	1030,7	3,02	604,6	11,56	2314,3	8,54	1709,7	—	—	10,0	12,5	11,25
Mittel der letzten 7 Tage . .	12,23	8,09	20,32	1030,9	2,96	602,3	11,54	2354,4	8,58	1743,1	Im Mittel der ganzen Periode 404,5	361,5	—	—	—
Im Mittel pro Kuh .	—	—	10,16	1030,9	2,96	301,1	11,54	1172,7	8,58	871,6	383,0		—	—	—

Am 8. Versuchstage (20./21. I.) wurde die Milch der beiden Kühe gesondert analysiert, die betreffenden Daten waren:

20./21. I.	12,69	—	—	1031,9	2,60	329,9	11,36	1441,6	8,76	1111,7	—	—	—	—	—
	—	7,96	—	1030,6	3,25	258,7	11,81	940,1	8,56	681,4	—	—	—	—	—

Versuchsreihe C. (Kuh Nr. 3 und 4). Hauptperiode II (Grundfutter + Harnstoff). Vom 23./24. Januar bis 6./7. Februar 1921.

Tabelle XXIV. Futterverzehr der Kühe (mittleres Gewicht 363,9 kg) im Mittel pro Kopf und Tag.

Ration	Trockensubstanz kg	Asche kg	Organ. Substanz kg	Rohprotein kg	Reineiw. kg	Amide kg	Rohfett kg	Rohfaser kg	N-fr. Extraktst. kg
5,45 kg Wiesenheu	4,5810	0,3248	4,2562	0,3995	0,3637	0,0358	0,0898	1,3926	2,3743
11,8 kg Zuckerrüben abzügl. 0,2871 kg N-fr. Extraktstoffe	2,7195	0,1192	2,6003	0,1699	0,0991	0,0708	0,0035	0,1416	2,2853
0,2871 kg N-fr. Extraktstoffe aus den Zuckerrüben	0,2871	—	0,2871	} 0,4370	—	0,4370	—	—	
und 0,15 kg Harnstoff	0,1499	—	0,1499						
Rohnährstoffe Summe	7,7375	0,4440	7,2935	1,0064	0,4628	0,5436	0,0933	1,5342	4,6596

Hierzu 106 g Salzgemisch.

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach den *Kellner*schen Tabellen.

In der Ration	Organ. Substanz %	Organ. Substanz kg	Rohprotein %	Rohprotein kg	Rohfett %	Rohfett kg	Rohfaser %	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe %	N-freie Extraktstoffe kg	Stärkewert in kg
5,45 kg Wiesenheu	57	2,41	50	0,20	49	0,04	55	0,77	59	1,40	1,62
11,8 kg Zuckerrüben abzüglich 0,2871 kg N-freie Extraktstoffe	91	2,36	55	0,09	-		34	0,05	97	2,22	1,76
0,2871 kg N-freie Extraktstoffe aus den Zuckerrüben } 0,15 kg Harnstoff	85	0,37	85	0,37	-	-	—	-	--	-	0,21
Verdauliche Nährstoffe Summe		5,14	—	0,66	—	0,04		0,82	-	3,62	3,59
Pro 1000 kg Lebendgewicht nnd Tag im Mittel	—	—	—	1,81	—	—	—	- -	-		9,87

Mittlerer Milchertrag } pro Kopf (363,9 kg) und Tag 11,16 kg; pro 500 kg Lebendgewicht und Tag 15,33 kg

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach unseren Stoffwechselversuchen an der Kuh Nr. 4.

	Verdauliches Rohprotein	Stärkewert
Wiesenheu	0,06 kg	1,26 kg
Zuckerrüben	0,09 kg	1,81 kg
Harnstoff + Kohlenhydrate	0,41 kg	0,38 kg
Summe	0,56 kg	3,45 kg
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	1,54 kg	9,48 kg
Nach dem Ausnutzungsversuch enthielt die Ration also in Prozenten der aus den Kellnerschen Tabellen vorstehend berechneten Werte nur	85,1 %	96,1 %

Tabelle XXV.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von den Kühen Nr. 3 und 4 in der Hauptperiode II (Grundfutter + Harnstoff).

Tag	Milchmenge			Spezifisches Gewicht	Fett		Trockensubstanz		Fettfreie Trockensubstanz		Gewicht		Stalltemperatur ° C		
1921	Kuh 3 kg	Kuh 4 kg	Summe kg		%	g	%	g	%	g	Kuh 3 kg	Kuh 4 kg	Min.	Max.	Mittel
23./24. I.	12,02	7,01	19,03	1031,3	2,85	542,4	11,51	2190,4	8,66	1648,0	—	—	10,5	14,5	12,5
24./25. I.	12,25	7,87	20,12	1030,7	3,26	655,9	11,85	2384,2	8,59	1728,3	390	360	10,5	14,5	12,5
25./26. I.	12,75	8,07	20,82	1031,4	2,99	622,5	11,70	2435,9	8,71	1813,4	—	—	11,5	15,5	13,5
26./27. I.	13,93	7,83	21,76	1030,9	3,16	687,6	11,78	2563,3	8,62	1875,7	—	—	12,0	14,0	13,0
27./28. I.	13,03	7,60	20,63	1031,1	2,93	604,5	11,55	2382,8	8,62	1778,3	380	349	11,0	13,0	12,0
28./29. I.	13,81	9,02	22,83	1030,4	3,10	707,7	11,58	2643,7	8,48	1936,0	—	—	11,5	14,5	13,0
29./30. I.	14,48	9,08	23,56	1030,5	3,05	718,6	11,55	2721,2	8,50	2002,6	—	—	13,5	16,0	14,75
30./31. I.	13,99	8,88	22,87	1030,3	3,01	688,4	11,45	2618,6	8,44	1930,2	—	—	14,0	17,0	15,5
31. I./1. II.	12,98	8,74	21,72	1030,2	2,91	632,1	11,30	2454,4	8,39	1822,3	—	—	14,0	18,0	16,0
1./2. II.	14,95	8,88	23,83	1030,4	2,93	698,2	11,38	2711,8	8,45	2013,6	380	343	13,0	16,5	14,75
2./3. II.	14,12	8,78	22,90	1030,6	2,90	664,1	11,39	2608,3	8,49	1944,2	—	—	13,5	15,5	14,5
3./4. II.	11,15	8,37	19,52	1031,1	2,60	507,5	11,16	2178,4	8,56	1670,9	—	—	13,0	15,0	14,0
4./5. II.	15,89	8,90	24,79	1031,0	3,17	785,8	11,82	2930,2	8,65	2144,4	—	—	12,0	15,0	13,5
5./6. II.	13,78	8,65	22,43	1030,4	2,80	628,0	11,22	2516,6	8,42	1888,6	—	—	12,0	14,0	13,0
6./7. II.	13,15	7,70	20,85	1030,1	2,95	615,1	11,33	2362,3	8,38	1747,2	369	340	10,5	13,5	12,0
Mittel der letzten 12 Tage	13,77	8,54	22,31	1030,6	2,96	661,4	11,46	2557,6	8,50	1896,2	Im Mittel der ganzen Periode 379,7	348,0	—	—	—
Im Mittel pro Kuh	—	—	11,16	1030,6	2,96	330,7	11,46	1278,8	8,50	948,1	363,9		—	—	—

Am 5. und 14. Versuchstage wurde die Milch der Kühe gesondert analysiert; die Ergebnisse waren folgende:

5. Tag	13,03	—	—	1031,3	2,70	351,8	11,33	1476,3	8,63	1124,5	—	—	—	—	—
27./28. I.	—	7,60	—	1030,0	3,40	258,4	11,84	899,8	8,44	641,4	—	—	—	—	—
14. Tag	13,78	—	—	1030,3	2,35	323,8	10,66	1468,9	8,31	1145,1	—	—	—	—	—
5./6. II.	—	8,65	—	1030,6	3,34	288,9	11,92	1031,1	8,58	742,2	—	—	—	—	—

Versuchsreihe C. (Kuh Nr. 3 und 4.) Periode III. Grundfutter (Heu + Zuckerrüben + Salze). Vom 7./8. bis 16./17. Februar 1921.

Tabelle XXVI.

Futterverzehr der Kühe (mittleres Gewicht 365,9 kg) im Mittel pro Kopf und Tag.

Ration	Trocken-substanz kg	Asche kg	Organ. Substanz kg	Roh-protein kg	Rein-eiweiß kg	Amide kg	Rohfett kg	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe kg
5,45 kg Wiesenheu	4,5810	0,3248	4,2562	0,3995	0,3637	0,0358	0,0898	1,3926	2,3743
11,8 kg Zuckerrüben	3,1399	0,1074	3,0325	0,1569	0,0920	0,0649	0,0035	0,1475	2,7246
Rohnährstoffe Summe	7,7209	0,4322	7,2887	0,5564	0,4557	0,1007	0,0933	1,5401	5,0989

Hierzu 106 g Salzgemisch.

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach den *Kellner*schen Tabellen.

In der Ration	Organische Substanz %	Organische Substanz kg	Rohprotein %	Rohprotein kg	Rohfett %	Rohfett kg	Rohfaser %	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe %	N-freie Extraktstoffe kg	Stärkewert in kg
Wiesenheu	57	2,41	50	0,20	49	0,04	55	0,77	59	1,40	1,62
Zuckerrüben	92	2,78	55	0,09	—	.	34	0,05	97	2.64	2,08
Verdauliche Nährstoffe Summe	—	5,19	—	0,29	—	0,04	—	0,82	—	4,04	3,70
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag im Mittel	—	—	—	**0,79**	—	—	—			—	**10,11**

Mittlerer Milchertrag { pro Kopf (365,9 kg) und Tag 8,53 kg
„ 500 kg Lebendgewicht und Tag 11,66 kg.

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach unseren Stoffwechselversuchen an der Kuh Nr. 4.

	Verdauliches Rohprotein	Stärkewert
Wiesenheu	0,06 kg	1,26 kg
Zuckerrüben	0,09 kg	2,20 kg
Summe	0,15 kg	3,46 kg
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	0,41 kg	9,46 kg
Nach dem Ausnutzungsversuch enthielt die Ration in Prozenten der aus den *Kellner*schen Tabellen berechneten Werte nur	51,9%	93,6%

Tabelle XXVII.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von den Kühen 3 und 4 in der Grundfutterperiode III (Heu + Zuckerrüben + Salze).

Tag	Milchmenge			Spezifisches Gewicht	Fett		Trockensubstanz		Fettfreie Trockensubstanz		Gewicht vom 6./7. II.		Stalltemperatur °C		
1921	Kuh 3 kg	Kuh 4 kg	Summe kg		%	g	%	g	%	g	Kuh 3 kg	Kuh 4 kg	Min.	Max.	Mittel
7./8. II.	14,83	8,61	23,44	1030,6	2,62	614,1	11,06	2592,5	8,44	1978,4	369	340	10,5	13,0	11,75
8./9. II.	11,88	7,71	19,59	1030,7	2,38	466,2	10,79	2113,7	8,41	1647,5	—	—	10,0	14,0	12,0
9./10. II.	12,64	7,74	20,38	1030,3	2,72	554,4	11,10	2262,2	8,38	1707,8	—	—	10,0	13,0	11,5
10./11. II.	11,68	7,05	18,73	1030,3	2,77	518,8	11,16	2090,2	8,39	1571,4	390	350	10,0	13,0	11,5
11./12. II.	10,69	6,78	17,47	1030,8	2,56	447,2	11,04	1928,7	8,48	1481,5	—	—	10,0	13,5	11,75
12./13. II.	11,51	6,55	18,06	1029,7	3,15	568,9	11,47	2071,5	8,32	1502,6	—	—	10,5	14,0	12,25
13./14. II.	10,73	6,46	17,19	1030,4	2,83	486,5	11,26	1935,6	8,43	1449,1	—	—	11,5	14,5	13,0
14./15. II.	9,71	6,33	16,04	1030,8	2,68	429,9	11,18	1793,3	8,50	1363,4	387	343	12,0	15,0	13,5
15./16. II.	11,25	6,11	17,36	1031,0	2,80	486,1	11,37	1973,8	8,57	1487,7	—	—	11,5	15,0	13,25
16./17. II.	8,07	6,44	14,51	1030,8	2,70	391,8	11,20	1625,2	8,50	1233,4	390	358	13,0	15,5	14,25
Im Mittel der letzten 7 Tage .	10,52	6,53	17,05	1030,5	2,79	475,6	11,24	1916,9	8,45	1441,3	Im Mittel der ganzen Periode 384,0	347,8	—	—	—
Im Mittel pro Kuh .	—	—	8,52	1030,5	2,79	237,8	11,24	958,4	8,45	720,6	365,9		—	—	—
Am 5. und 9. Versuchstage wurde die Milch der beiden Kühe gesondert analysiert, die Ergebnisse waren folgende:															
5. Tag } 11./12. II.	10,69	—	—	1030,9	1,92	205,2	10,29	1100,0	8,37	894,8	—	—	—	—	—
	—	6,78	—	1031,1	3,49	236,6	11,98	812,2	8,49	575,6	—	—	—	—	—
9. Tag } 15./16. II.	11,25	—	—	1031,1	2,15	241,9	10,62	1194,7	8,47	952,8	—	—	—	—	—
	—	6,11	—	1030,3	4,09	249,9	12,75	779,0	8,66	529,1	—	—	—	—	—

Versuchsreihe C. (Kühe Nr. 3 u. 4.) Hauptperiode IV (Grundfutter + Harnstoff + Zuckerrüben.) Vom 17./18. Febr. bis 27./28. Febr. 1921.

Tabelle XXVIII. Futterverzehr der Kühe (Mittleres Gewicht 365,0 kg) im Mittel pro Kopf und Tag.

Ration	Trock.-Subst. kg	Asche kg	Organ. Subst. kg	Roh-protein kg	Rein-eiweiß kg	Amide kg	Rohfett kg	Roh-faser kg	N-fr. Ex-traktst. kg
5,48 kg Wiesenheu	4,5810	0,3248	4,2562	0,3995	0,3637	0,0358	0,0898	1,3926	2,3743
15,61 kg Zuckerrüben abzügl. 0,2871 kg N-freie Extraktstoffe	3,8902	0,1343	3,7559	0,2217	0,1296	0,0921	0,0046	0,1967	3,3329
0,2871 kg N-freie Extraktstoffe aus den Rüben und 0,15 kg Harnstoff	0,2871 0,1499	—	0,2871 0,1499	0,4370*)	—	0,4370	—	—	—
Rohnährstoffe Summe	8,9082	0,4591	8,4491	1,0582	0,4933	0,5649	0,0944	1,5893	5,7072

hierzu 106 g Salzgemisch.

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach den Kellnerschen Tabellen.

In der Ration	Organische Substanz %	Organische Substanz kg	Rohprotein %	Rohprotein kg	Rohfett %	Rohfett kg	Rohfaser %	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe %	N-freie Extraktstoffe kg	Stärkewert kg
5,48 kg Wiesenheu	57	2,41	50	0,20	49	0,04	55	0,77	59	1,40	1,62
15,61 kg Zuckerrüben abzgl. 0,2871 N-freie Extraktstoffe	91	3,42	55	0,12	—	—	34	0,07	97	3,23	2,56
0,2871 kg N-freie Extraktst. a. d. Zuckerrüben + 0,15 kg Harnstoff	85	0,37	85	0,37	—	—	—	—	—	—	0,21**)
Verdauliche Nährstoffe Summe	—	6,20	—	0,69	—	0,04	—	0,84	—	4,63	4,39
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	—	—	—	1,89	—	—	—	—	—	—	12,08

Mittlerer Milchertrag { Pro Kopf (365 kg) und Tag = 9,12 kg
Pro 500 kg Lebendgewicht und Tag = 12,49 kg

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach unseren Stoffwechselversuchen an der Kuh Nr. 4.

	Verdauliches Rohprotein	Stärkewert
Wiesenheu	0,06 kg	1,26 kg
Zuckerrüben	0,12 kg	2,81 kg
Harnstoff + Kohlenhydrate	0,41 kg	0,38 kg
Summe	0,59 kg	4,45 kg
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	1,62 kg	12,19 kg
Nach dem Ausnutzungsversuch enthielt die Ration also in Prozenten der aus den *Kellner*'schen Tabellen berechneten Werte	85,7%	101,3%

*) Diese Zeitschr. 102, 168. 1920.
**) Stärkewert der 0,2871 kg Kohlenhydrate.

Tabelle XXIX.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von den Kühen Nr. 3 und 4 in der Hauptperiode IV (Grundfutter + Zuckerrüben + Harnstoff).

Tag	Milchmenge			Spezifisches Gewicht	Fett		Trockensubstanz		Fettfreie Trockensubstanz		Gewicht		Stalltemperatur °C		
1921	Kuh 3 kg	Kuh 4 kg	Summe kg		%	g	%	g	%	g	Kuh 3 kg	Kuh 4 kg	Min.	Max.	Mittel
17./18. II.	10,85	6,40	17,25	1030,7	2,99	515,8	11,53	1989,0	8,54	1473,2	390	358	14,0	6,01	15,0
18./19. II.	11,92	6,07	17,99	1030,8	3,19	563,1	11,72	2108,4	8,59	1545,3	—	—	13,0	15,5	14,25
19./20. II.	12,08	6,33	18,41	1030,9	3,13	587,2	11,82	2176,0	8,63	1588,8	—	—	13,5	16,5	15,0
20./21. II.	10,32	6,44	16,76	1031,0	2,73	457,5	11,29	1892,1	8,56	1434,6	380	340	13,0	16,0	14,5
21./22. II.	13,60	6,57	20,17	1030,7	3,20	645,4	11,78	2376,0	8,58	1730,6	—	—	12,0	16,5	14,25
22./23. II.	12,41	6,96	19,37	1030,7	3,36	650,8	11,97	2318,6	8,61	1667,8	—	—	11,5	15,5	13,5
23./24. II.	11,32	7,07	18,39	1030,7	3,00	551,7	11,54	2122,2	8,54	1570,5	—	—	13,0	16,5	14,75
24./25. II.	9,36	7,43	16,79	1030,3	3,00	503,7	11,44	1920,8	8,44	1417,1	380	350	13,0	16,0	14,50
25./26. II.	9,99	7,54	17,53	1029,8	3,15	552,2	11,49	2014,2	8,34	1462,0	—	—	13,5	17,0	15,25
26./27. II.	10,74	7,62	18,36	1029,3	2,97	545,3	11,15	2047,1	8,18	1501,8	—	—	13,0	16,5	14,75
27./28. II.	10,83	7,71	18,54	1029,7	3,25	602,5	11,59	2148,8	8,34	1546,3	377	345	13,0	17,0	15,0
Im Mittel der letzten 8 Tage . .	11,07	7,17	18,24	1030,2	3,09	563,6	11,54	2105,0	8,45	1541,4	Im Mittel der ganzen Periode 381,8	348,3	—	—	—
Im Mittel pro Kuh .	—	—	9,12	1030,2	3,09	281,8	11,54	1052,5	8,45	770,7	365,0		—	—	—

Am 5., 9. und 10. Versuchstage wurde die Milch der beiden Kühe gesondert analysiert. Es wurden folgende Daten erhalten:

Tag	Kuh 3 kg	Kuh 4 kg	Summe kg	Spezifisches Gewicht	Fett %	Fett g	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Fettfreie Trockensubstanz %	Fettfreie Trockensubstanz g	Gewicht Kuh 3 kg	Gewicht Kuh 4 kg	Min.	Max.	Mittel
5. Tag	13,60	—	—	1030,8	2,68	364,5	11,18	1520,5	8,50	1156,0	—	—	—	—	—
21./22. II.	—	6,57	—	1031,0	4,42	290,4	13,32	875,1	8,90	584,7	—	—	—	—	—
9. Tag	9,99	—	—	1029,2	2,75	274,7	10,86	1084,9	8,11	810,2	—	—	—	—	—
25./26. II.	—	7,54	—	1030,2	3,65	275,2	12,19	919,1	8,54	643,9	—	—	—	—	—
10. Tag*)	11,27	—	—	1028,8	3,30	371,9	11,42	1287,0	8,12	915,1	—	—	—	—	—
26./27. II.	—	7,71	—	1029,5	3,30	254,4	11,60	894,3	8,30	639,9	—	—	—	—	—

*) Die Tagesmilchmengen setzen sich im allgemeinen zusammen aus den Gemelken am Mittag, Abend und dem folgenden Morgen. Im vorliegenden Falle wurde dagegen am 10. Versuchstage die Milch des Abend-, Morgen- und Mittagsgemelkes zur Analyse benutzt. Hieraus erklärt sich die Unstimmigkeit bezüglich der Milchmenge des 10. Versuchstages.

Versuchsreihe C. (Kühe Nr. 3 und 4.) Hauptperiode V (Grundfutter + Erdnußkuchen). Vom 28. Februar/1. März bis 7./8. März 1921

Tabelle XXX.

Futterverzehr der Kühe Nr. 3 und 4 (mittleres Gewicht 360,7 kg) im Mittel pro Kopf und Tag.

Ration	Trocken-substanz kg	Asche kg	Organ. Substanz kg	Roh-protein kg	Rein-eiweiß kg	Amide kg	Rohfett kg	Rohfaser kg	N-fr. Extraktst. kg
5,48 kg Wiesenheu	4,5810	0,3248	4,2562	0,3995	0,3637	0,0358	0,0898	1,3926	2,3743
11,8 kg Zuckerrüben	3,1577	0,1015	3,0562	0,1676	0,0980	0,0696	0,0035	0,1487	2,7364
0,877 kg Erdnußkuchen	0,7931	0,0535	0,7396	0,4475	0,4056	0,0419	0,0518	0,0332	0,2071
Rohnährstoffe Summe	8,5318	0,4798	8,0520	1,0146	0,8673	0,1473	0,1451	1,5745	5,3178

Hierzu 106 g Salzgemisch.

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach den *Kellner*schen Tabellen.

In der Ration	Organ. Substanz		Rohprotein		Rohfett		Rohfaser		Stickstoffreie Extraktstoffe		Stärkewert
	%	kg	%	kg	%	kg	%	kg	%	kg	kg
5,48 kg Wiesenheu	57	2,41	50	0,20	49	0,04	55	0,77	59	1,40	1,62
11,8 kg Zuckerrüben	92	2,80	55	0,09	—	—	34	0,05	97	2,66	2,09
0,877 kg Erdnußkuchen	85	0,63	90	0,40	90	0,05	9	0,003	84	0,18	0,67
Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert pro Kopf und Tag Summe	—	5,84	—	0,69	—	0,09	—	0,823	—	4,24	4,38
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	—	—	—	**1,91**	—	—	—	—	—	—	**12,14**

Mittlerer Milchertrag { pro Kopf (360,7 kg) und Tag 9,52 kg
„ 500 kg Lebendgewicht und Tag 13,20 kg.

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach unseren Stoffwechselversuchen an der Kuh Nr. 4.

	Verdauliches Rohprotein	Stärkewert
Wiesenheu	0,06 kg	1,26 kg
Zuckerrüben	0,09 kg	2,14 kg
Erdnußkuchen	0,37 kg	0,49 kg
Summe	0,52 kg	3,89 kg
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	1,44 kg	10,78 kg
Nach dem Ausnutzungsversuch enthielt die Ration also in Prozenten der aus den *Kellner*schen Tabellen berechneten Werte nur	75,4%	[illegible]

Tabelle XXXI.

Erträge an Milch u. Milchbestandteilen von den Kühen Nr. 3 u. 4 in der Hauptperiode V (Grundfutter + Erdnußkuchen).

Tag	Milchmenge			Spezifisches Gewicht	Fett		Trockensubstanz		Fettfreie Trockensubstanz		Gewicht		Stalltemperatur ° C		
1921	Kuh 3 kg	Kuh 4 kg	Summe kg		%	g	%	g	%	g	Kuh 3 kg	Kuh 4 kg	Min.	Max.	Mittel
28. II./1. III.	11,32	7,41	18,73	1030,1	2,75	515,1	11,09	2077,2	8,34	1562,1	377	345	14,0	16,0	15,0
1./2. III.	10,36	7,44	17,80	1030,6	2,69	478,8	11,14	1982,9	8,45	1504,1	365	346	14,0	17,0	15,5
2./3. III.	11,73	7,12	18,85	1030,3	2,68	505,2	11,05	2082,9	8,37	1577,7	—	—	15,0	16,0	15,5
3./4. III.	7,97	7,45	15,42	1030,5	3,24	499,6	11,78	1816,5	8,54	1316,9	—	—	14,0	15,0	14,5
4./5. III.	15,10	7,52	22,62	1030,4	3,10	701,2	11,58	2619,4	8,48	1918,2	370	345	13,0	15,5	14,25
5./6. III.	11,99	7,11	19,10	1030,7	2,90	553,9	11,42	2181,2	8,52	1627,3	—	—	14,0	17,0	15,5
6./7. III.	11,39	7,78	19,17	1031,0	2,88	552,1	11,47	2198,8	8,59	1646,7	380	350	14,0	17,0	15,5
7./8. III.	11,24	7,66	18,90	1031,5	3,04	574,5	11,79	2228,3	8,75	1653,8	379	350	13,0	14,0	13,5
Im Mittel der letzten 5 Tage . .	11,54	7,50	19,04	1030,8	3,03	576,2	11,60	2208,8	8,57	1632,6	Im Mittel der ganzen Periode 374,2	347,2	—	—	—
Im Mittel pro Kuh . .	—	—	9,52	1030,8	3,03	288,1	11,60	1104,4	8,57	816,3	360,7		—	—	

Am 5., 7. und 8. Versuchstage wurde die Milch der beiden Kühe gesondert analysiert mit folgenden Ergebnissen:

5. Tag 4./5. III.	15,10	—	—	1030,5	2,78	419,8	11,22	1694,2	8,44	1274,4	—	—	—	—	—
	—	7,52	—	1030,2	3,77	283,5	12,34	928,0	8,57	644,5	—	—	—	—	—
7. Tag 6./7. III.	11,39	—	—	1030,8	2,35	267,7	10,78	1227,9	8,43	960,2	—	—	—	—	—
	—	7,78	—	1029,7	3,70	287,9	12,13	943,7	8,43	655,8	—	—	—	—	—
8. Tag 7./8. III.	11,24	—	—	1031,7	2,56	287,8	11,26	1265,7	8,70	977,9	—	—	—	—	—
	—	7,66	—	1030,6	3,75	287,2	12,41	950,6	8,66	663,4	—	—	—	—	—

Versuchsreihe C. (Kühe Nr. 3 und 4.) Periode VI. Grundfutter (Heu + Zuckerrüben + Salze). Vom 8./9. März bis 17./18. März 1921.

Tabelle XXXII.

Futterverzehr der Kühe Nr. 3 und 4 (mittleres Gewicht 367,1 kg) im Mittel pro Kopf und Tag.

Ration	Trockensubstanz kg	Asche kg	Organ. Substanz kg	Rohprotein kg	Reineiweiß kg	Amide kg	Rohfett kg	Rohfaser kg	N-fr. Extraktst. kg
5,46 kg Wiesenheu	4,5810	0,3248	4,2562	0,3995	0,3637	0,0358	0,0898	1,3926	2,3743
11,8 kg Zuckerrüben	3,2521	0,1133	3,1388	0,1687	0,0991	0,0696	0,0035	0,1534	2,8132
Rohnährstoffe Summe	7,8331	0,4381	7,3950	0,5682	0,4628	0,1054	0,0933	1,5460	5,1875

Hierzu 106,0 g Salzgemisch.

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach den *Kellner*schen Tabellen.

In der Ration	Organ. Substanz %	Organ. Substanz kg	Rohprotein %	Rohprotein kg	Rohfett %	Rohfett kg	Rohfaser %	Rohfaser kg	N-fr. Extraktst. %	N-fr. Extraktst. kg	Stärkewert kg
Wiesenheu	57	2,41	50	0,20	49	0,04	55	0,77	59	1,40	1,62
Zuckerrüben	91	2,87	55	0,09	—	—	34	0,05	97	2,73	2,15
Verdauliche Nährstoffe Summe	—	5,28	—	0,29	—	0,04	—	0,82	—	4,13	3,77
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	—	—	—	**0,79**	—	—	—	—	—	—	**10,27**

Mittlerer Milchertrag { pro Kopf (367,1 kg) und Tag 7,32 kg
„ 500 kg Lebendgewicht und Tag 9,97 kg.

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach unseren Stoffwechselversuchen an der Kuh Nr. 4.

	Verdauliches Rohprotein	Stärkewert
Wiesenheu	0,06 kg	1,26 kg
Zuckerrüben	0,09 kg	2,20 kg
Summe	0,15 kg	3,46 kg
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	0,41 kg	9,43 kg
Nach dem Ausnutzungsversuch enthielt die Ration also in Prozenten der aus den *Kellner*schen Tabellen berechneten Werte nur	51,9%	91,8%

Tabelle XXXIII.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von den Kühen Nr. 3 und 4 in der Grundfutterperiode VI (Heu + Zuckerrüben + Salze).

Tag	Milchmenge			Spezifisches Gewicht	Fett		Trockensubstanz		Fettfreie Trockensubstanz		Gewicht		Stalltemperatur °C		
1921	Kuh 3 kg	Kuh 4 kg	Summe kg		%	g	%	g	%	g	Kuh 3 kg	Kuh 4 kg	Max.	Min.	Mittel
8./9. III.	11,41	8,07	19,48	1030,4	2,76	537,7	11,18	2177,9	8,42	1640,2	379	350	15,0	12,0	13,5
9./10. III.	11,18	7,19	18,37	1030,0	2,95	541,9	11,30	2075,8	8,35	1533,9	—	—	14,0	12,0	13,0
10./11. III.	9,74	6,83	16,57	1030,6	2,50	414,2	10,91	1807,8	8,41	1393,6	—	—	14,0	12,0	13,0
11./12. III.	10,36	6,45	16,81	1029,8	2,89	485,8	11,18	1879,4	8,29	1393,6	370	349	16,0	14,0	15,0
12./13. III.	7,73	6,45	14,18	1030,5	2,58	365,9	10,98	1557,0	8,40	1191,1	—	—	17,0	14,0	15,5
13./14. III.	10,83	6,39	17,22	1029,9	3,08	530,4	11,43	1968,2	8,35	1437,8	—	—	17,0	15,0	16,0
14./15. III.	6,90	5,55	12,45	1030,8	2,39	297,6	10,83	1348,4	8,44	1050,8	388	346	17,0	15,0	16,0
15./16. III.	9,08	6,15	15,23	1030,3	2,91	443,2	11,33	1725,6	8,42	1282,4	—	—	18,0	14,0	16,0
16./17. III.	7,39	6,11	13,50	1030,7	2,60	351,0	11,06	1493,1	8,46	1142,1	392	355	18,0	13,0	15,5
17./18. III.	9,10	6,09	15,19	1030,5	2,55	387,3	10,95	1663,3	8,40	1276,0	393	349	17,0	14,0	15,5
Im Mittel der letzten 6 Tage . .	8,51	6,12	14,63	1030,4	2,70	395,9	11,11	1625,9	8,41	1230,0	Im Mittel der ganzen Periode 384,4	349,8	—	—	—
Im Mittel pro Kuh .	—	—	7,32	1030,4	2,70	198,0	11,11	813,0	8,41	615,0	367,1		—	—	—
Am 5., 7., 9. und 10. Versuchstage wurde die Milch der beiden Kühe gesondert analysiert. Es ergaben sich folgende Werte:															
5. Tag 12./13. III.	7,73	—	—	1030,3	1,88	145,3	10,09	779,9	8,21	634,6	—	—	—	—	—
	—	6,45	—	1030,1	3,32	214,2	11,77	759,2	8,45	545,0	—	—	—	—	—
7. Tag 14./15. III.	6,90	—	—	1030,8	1,50	103,5	9,76	673,4	8,26	569,9	—	—	—	—	—
	—	5,55	—	1030,5	3,50	194,3	12,09	671,0	8,59	476,7	—	—	—	—	—
9. Tag 16./17. III.	7,39	—	—	1030,6	2,00	147,8	10,31	761,9	8,31	614,1	—	—	—	—	—
	—	6,11	—	1030,4	3,33	203,4	11,86	724,6	8,58	521,2	—	—	—	—	—
10. Tag 17./18. III.	9,10	—	—	1030,3	2,16	196,5	10,43	949,1	8,27	752,6	—	—	—	—	—
	—	6,09	—	1030,2	3,15	191,8	11,59	705,8	8,44	514,0	—	—	—	—	—

2. Die Versuche an der Kuh Nr. 1.

Versuchsreihe C. Kuh Nr. 1. Grundfutterperiode III (Heu + Zuckerrüben + Salze). Vom 7./8. Febr. bis 16./17. Febr. 1921.

Tabelle XXXIV. Futterverzehr der Kuh Nr. 1 (mittleres Gewicht 440,5 kg) im Mittel pro Tag.

Ration	Trockensubstanz kg	Asche kg	Organ. Substanz kg	Rohprotein kg	Reineiweiß kg	Amide kg	Rohfett kg	Rohfaser kg	N-fr. Extraktst. kg
6,93 kg Wiesenheu	5,8300	0,4130	5,4170	0,5084	0,4629	0,0455	0,1140	1,7720	3,0226
15,0 kg Zuckerrüben	3,9910	0,1365	3,8545	0,1995	0,1170	0,0825	0,0045	0,1875	3,4630
Rohnährstoffe . Sa.	9,8210	0,5495	9,2715	0,7079	0,5799	0,1280	0,1185	1,9595	6,4856

Hierzu 135,0 g Salzgemisch.

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach den *Kellner*schen Tabellen.

In der Ration	Organ. Substanz %	Organ. Substanz kg	Rohprotein %	Rohprotein kg	Rohfett %	Rohfett kg	Rohfaser %	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe %	N-freie Extraktstoffe kg	Stärkewert kg
6,93 kg Wiesenheu	57	3,07	50	0,25	49	0,06	55	0,97	59	1,78	2,07
15,0 kg Zuckerrüben	92	3,53	55	0,11	—	—	34	0,06	97	3,36	2,64
Verdaul. Nährst. Sa.		6,60	—	0,36	—	0,06	—	1,03	—	5,14	4,71
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag			—	**0,82**	—	—	—	—	—	—	10,69

Mittlerer Milchertrag { pro Kopf (440,5 kg) und Tag 9,10 kg
pro 500 kg Lebendgewicht und Tag 10,33 kg }

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach unseren Stoffwechselversuchen an der Kuh Nr. 4.

	Verdauliches Rohprotein	Stärkewert
Wiesenheu	0,08 kg	1,61 kg
Zuckerrüben	0,11 kg	2,70 kg
Summa	0,19 kg	4,31 kg
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	0,43 kg	9,78 kg
Nach dem Ausnutzungsversuch enthielt die Ration also in Proz. der aus den *Kellner*schen Tabellen berechneten Werte nur	52,4%	91,5%

Tabelle XXXV. Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 1 in der Grundfutterperiode III (Heu + Zuckerrüben + Salze).

Tag 1921	Milchmenge kg	Spez. Gewicht	Fett %	Fett g	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Fettfr. Trockensubstanz %	Fettfr. Trockensubstanz g	Gewicht der Kuh kg	Stalltemperatur °C Min.	Max.	Mittel
7. 8. II.	10,87	1029,7	3,20	347,8	11,53	1253,3	8,33	905,5	420	10,5	13,0	11,75
8. 9. II.	10,33	1029,3	2,95	304,7	11,13	1149,7	8,18	845,0	—	10,0	14,0	12,0
9. 10. II.	10,34	1028,6	3,20	330,9	11,25	1163,3	8,05	832,4	—	10,0	13,0	11,5
10. 11. II.	9,33	1029,2	3,12	291,1	11,31	1055,2	8,19	764,1	450	10,0	13,0	11,5
11. 12. II.	9,83	1028,9	3,08	302,8	11,18	1099,0	8,10	796,2	—	10,0	13,5	11,75
12. 13. II.	9,27	1029,0	3,08	285,5	11,21	1039,2	8,13	753,7	—	10,5	14,0	12,25
13. 14. II.	8,73	1029,2	3,09	269,8	11,27	983,9	8,18	714,1	—	11,5	14,5	13,0
14. 15. II.	9,15	1028,8	2,88	263,5	10,92	999,2	8,04	735,7	449	12,0	15,0	13,5
15. 16. II.	9,35	1028,8	2,93	273,9	10,98	1026,6	8,05	752,7	—	11,5	15,0	13,25
16. 17. II.	8,07	1029,1	3,09	249,4	11,24	907,1	8,15	657,7	443	13,0	15,5	14,25
Im Mittel der letzten 7 Tage	9,10	1029,0	3,04	276,6	11,16	1015,8	8,12	739,2	Im Mittel der ganz. Periode 440,5	—	—	—

Versuchsreihe C. (Kuh Nr. 1.) Hauptperiode IV (Grundfutter + Harnstoff [illegible]

Tabelle XXXVI. Futterverzehr der Kuh Nr. 1 (mittleres Gewicht 440,8 kg) im Mittel pro Tag.

Ration	Trocken-subst. kg	Asche kg	Organ. Subst. kg	Rohprotein kg	Rein-eiweiß kg	Amide kg	Rohfett kg	Roh-faser kg	N-fr. Ex-traktst. kg
6,93 kg Wiesenheu	5,8300	0,4130	5,4170	0,5084	0,4629	0,0455	0,1140	1,7720	3,0226
18,81 kg Zuckerrüben abzügl. 0,2871 kg Kohlenhydrate	4,7465	0,1618	4,5847	0,2671	0,1561	0,1110	0,0057	0,2370	4,0749
0,2871 kg N-freie Extraktstoffe aus den Rüben und 0,15 kg	0,2871	—	0,2871	0,4370*)	—	0,4370	—	—	—
Harnstoff	0,1499	—	0,1499						
Rohnährstoffe Summe	11,0135	0,5748	10,4387	1,2125	0,6190	0,5935	0,1197	2,0090	7,0975

Hierzu 135 g Salzgemisch.

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach den *Kellner*schen Tabellen.

In der Ration	Organische Substanz %	Organische Substanz kg	Rohprotein %	Rohprotein kg	Rohfett %	Rohfett kg	Rohfaser %	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe %	N-freie Extraktstoffe kg	Stärkewert kg
6,93 kg Wiesenheu	57	3,07	50	0,25	49	0,06	55	0,97	59	1,78	2,07
18,81 kg Zuckerrüben	91	4,18	55	0,15	—	—	34	0,08	97	3,95	3,13
0,2871 kg N-freie Extraktst. a. d. Rüben und 0,15 kg Harnstoff	85	0,37	85	0,37	—	—	—	—	—	—	0,21**)
Verdauliche Nährstoffe Summe	—	7,62	—	0,77	—	0,06	—	1,05	—	5,73	5,41
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	—	—	—	**1,74**	—	—	—	—	—	—	**12,27**

Mittlerer Milchertrag { pro Kopf (440,8 kg) und Tag: 9,66 kg
„ 500 kg Lebendgewicht und Tag: 10,96 kg

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach unseren Stoffwechselversuchen an der Kuh Nr. 4.

	Verdauliches Rohprotein	Stärkewert
Wiesenheu	0,08 kg	1,61 kg
Zuckerrüben	0,15 kg	3,20 kg
Harnstoff + Kohlenhydrate	0,41 kg	0,38 kg
Summe	0,64 kg	5,19 kg
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	1,45 kg	11,77 kg
Nach dem Ausnutzungsversuch enthielt die Ration also in Prozenten der aus den Kellnerschen Tabellen berechneten Werte nur	83,3%	95,9%

*) Siehe Anmerkung * auf Seite 356.
**) Stärkewert der 0,2871 kg Kohlenhydrate.

Tabelle XXXVII.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 1 in der Hauptperiode IV (Grundfutter + Zuckerrüben + Harnstoff).

Tag 1921	Milchmenge kg	Spezifisches Gewicht g	Fett %	Fett g	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Fettfreie Trockensubstanz %	Fettfreie Trockensubstanz g	Gewicht der Kuh kg	Stalltemperatur °C Min.	Stalltemperatur °C Max.	Stalltemperatur °C Mittel
17. 18. II.	8,65	1029,9	3,10	268,2	11,46	991,3	8,36	723,1	443	14,0	16,0	15,0
18. 19. II.	9,12	1029,8	3,20	291,8	11,55	1053,3	8,35	761,5	—	13,0	15,5	14,25
19. 20. II.	9,73	1029,3	3,17	308,4	11,39	1108,2	8,22	799,8	—	13,5	16,5	15,0
20./21. II.	10,28	1029,5	3,05	313,5	11,30	1161,6	8,25	848,1	430	13,0	16,0	14,5
21./22. II.	10,03	1029,6	2,60	260,8	10,78	1081,2	8,18	820,4	—	12,0	16,5	14,25
22./23. II.	9,59	1028,9	3,40	326,1	11,57	1109,6	8,17	783,5	—	11,5	15,5	13,5
23./24. II.	9,85	1029,4	2,90	285,6	11,09	1092,3	8,19	806,7	—	13,0	16,5	14,75
24./25. II.	9,74	1029,3	3,07	299,0	11,27	1097,7	8,20	798,7	440	13,0	16,0	14,50
25./26. II.	9,75	1028,8	3,07	299,3	11,14	1086,1	8,07	786,8	—	13,5	17,0	15,25
26./27. II.	9,22	1029,3	3,15	290,4	11,37	1048,3	8,22	757,9	—	13,0	16,5	14,75
27./28. II.	8,81	1029,6	3,07	270,5	11,35	1000,0	8,28	729,5	450	13,0	17,0	15,0
Im Mittel der letzten 8 Tage . .	9,66	1029,3	3,04	293,2	11,23	1084,6	8,19	791,4	Im Mittel der ganzen Periode 440,8	—	—	—

Versuchsreihe C. (Kuh Nr. 1.) Hauptperiode V (Grundfutter + Erdnußkuchen). Vom 28. Februar/1. März bis 7./8. März 1921.

Tabelle XXXVIII.

Futterverzehr der Kuh (mittleres Gewicht 449,8 kg) im Mittel pro Tag.

Ration	Trocken-substanz kg	Asche kg	Organische Substanz kg	Rohprotein kg	Reineiweiß kg	Amide kg	Rohfett kg	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe kg
6,93 kg Wiesenheu	5,8300	0,4130	5,4170	0,5084	0,4629	0,0455	0,1140	1,7720	3,0226
15,0 kg Zuckerrüben	4,0140	0,1290	3,8850	0,2130	0,1245	0,0885	0,0045	0,1890	3,4785
0,877 kg Erdnußkuchen	0,7931	0,0535	0,7396	0,4475	0,4056	0,0419	0,0518	0,0332	0,2071
Rohnährstoffe Summe.	10,6371	0,5955	10,0416	1,1689	0,9930	0,1759	0,1703	1,9942	6,7082
Hierzu 135 g Salze.									

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach den *Kellner*schen Tabellen.

In der Ration	Organ. Substanz		Rohprotein		Rohfett		Rohfaser		N-freie Extraktstoffe		Stärkewert
	%	kg	%	kg	%	kg	%	kg	%	kg	kg
6,93 kg Wiesenheu	57	3,07	50	0,25	49	0,06	55	0,97	59	1,78	2,07
15,0 kg Zuckerrüben	92	3,56	55	0,12	—	—	34	0,06	97	3,38	2,66
0,877 kg Erdnußkuchen	85	0,63	90	0,40	90	0,05	9	0,003	84	0,18	0,67
Verdauliche Nährstoffe Summe . .	—	7,26	—	0,77	—	0,11	—	1,03	—	5,34	5,40
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	—	—	—	**1,71**	—	—	—	—	—	—	**12,00**

Mittlerer Milchertrag { pro Kopf (449,8 kg) und Tag 10,10 kg
„ 500 kg Lebendgewicht und Tag 11,23 kg

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach unseren Stoffwechselversuchen an der Kuh Nr. 4.

	Verdauliches Rohprotein	Stärkewert
Wiesenheu	0,08 kg	1,61 kg
Zuckerrüben	0,12 kg	2,72 kg
Erdnußkuchen	0,37 kg	0,49 kg
Summe	0,57 kg	4,82 kg
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	1,33 kg	10,72 kg
Nach dem Ausnutzungsversuch enthielt die Ration also in Prozenten der aus den *Kellner*schen Tabellen berechneten Werte nur	77,8 %	89,3%

Tabelle XXXIX. **Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 1 in der Hauptperiode V (Grundfutter + Erdnußkuchen).**

Tag 1921	Milchmenge kg	Spez. Gewicht g	Fett %	Fett g	Trockensubst. %	Trockensubst. g	Fettfr. Trockensubstanz %	Fettfr. Trockensubstanz g	Gewicht der Kuh kg	Stalltemperatur °C Min.	Max.	Mittel
28. II. 1. III.	8,71	1029,5	2,88	250,8	11.09	965.9	8,21	715,1	450	14,0	16.0	15.0
1. 2. III.	9,26	1029,6	3.02	279.7	11.29	1045,5	8.27	765,8	450	14,0	17,0	15.5
2. 3. III.	9.60	1029,5	3.07	294,7	11,32	1086,7	8,25	792,0	—	15,0	16,0	15.5
3. 4. III.	9,76	1029,6	2.95	287,9	11,20	1093,1	8.25	805,2	—	14,0	15,0	14.5
4. 5. III.	10.05	1029.5	3,60	361,8	11,96	1202,0	8,36	840,2	450	13,0	15,5	14.25
5. 6. III.	10,21	1029,1	4,10	418,6	12,46	1272,2	8,36	853,6	—	14,0	17,0	15.5
6. 7. III.	10,49	1029,4	3,44	360.9	11,74	1231,6	8,30	870,7	450	14,0	17,0	15.5
7. 8. III.	10,01	1030,0	3,49	349.4	11,95	1196,2	8,46	846,8	449	13,0	14,0	13,5
Im Mittel der letzten 5 Tage . .	10,10	1029,5	3.52	355,7	11.87	1199,0	8,35	843,3	Im Mittel der ganz. Periode 449,8	—	—	—

Versuchsreihe C. (Kuh Nr. 1.) **Grundfutterperiode VI (Heu + Zuckerrüben + Salze).**
Vom 8./9. März bis 15./16. März 1921.

Tabelle XL. **Futterverzehr der Kuh (mittleres Gewicht 446,5 kg) im Mittel pro Tag.**

Ration	Trockensubstanz kg	Asche kg	Organ. Substanz kg	Rohprotein kg	Reineiweiß kg	Amide kg	Rohfett kg	Rohfaser kg	N-fr. Extraktst. kg
6,94 kg Wiesenheu.	5,8300	0,4130	5.4170	0.5084	0,4629	0,0455	0,1140	1,7720	3,0226
15,0 kg Zuckerrüben	4,1340	0,1440	3,9900	0,2145	0,1260	0,0885	0,0045	0,1950	3,5700
Rohnährstoffe Sa. .	9,9640	0,5570	9,4070	0,7229	0,5889	0,1340	0,1185	1,9670	6,59[illegible]

Hierzu 135 g Salzgemisch.

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach den *Kellner*schen Tabellen.

In der Ration	Organ. Substanz %	Organ. Substanz kg	Rohprotein %	Rohprotein kg	Rohfett %	Rohfett kg	Rohfaser %	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe %	N-freie Extraktstoffe kg	Stärkewert kg
6,94 kg Wiesenheu	57	3,07	50	0,25	49	0,06	55	0,97	59	1,78	2,07
15,0 kg Zuckerr.	92	3,65	55	0,12	—	—	34	0,06	97	3,47	2,73
Verdaul. Nährst. Sa.	—	6,72	—	0,37	—	0,06	—	1,03	—	5,25	4.80
Pro 1000 kg Lebendgewicht	—	—	—	**0,83**	—	—	—	—	—	—	**10,75**

Mittlerer Milchertrag { pro Kopf (446,5 kg) und Tag 7,74 kg
" 500 kg Lebendgew. und Tag 8,67 kg

Verdauliche Nährstoffe und Stärkewert nach unseren Stoffwechselversuchen an der Kuh Nr. 1.

	Verdauliches Rohprotein	Stärkewert
Wiesenheu	0,08 kg	1.61 kg
Zuckerrüben	0,12 kg	2.80 kg
Summe	0.20 kg	4,41 kg
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	0,45 kg	9,88 kg
Nach dem Ausnutzungsversuch enthielt die Ration also in Proz. der aus den *Kellner*schen Tabellen berechneten Werte nur	54,2%	91,9%

Tabelle ...

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 1 in der Grundfutterperiode VI (Heu + Zuckerrüben + Salze).

Datum 1921	Milchmenge kg	Spezifisch. Gewicht	Fett %	Fett g	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Fettfreie Trockensubstanz %	Fettfreie Trockensubstanz g	Gewicht der Kuh kg	Stalltemperatur °C Max.	Min.	Mittel
8./9. III.	9,71	1029,6	3,45	335,0	11,80	1145,8	8,35	810,8	449	15,0	12,0	13,5
9./10. III.	9,60	1029,2	3,31	317,8	11,53	1106,9	8,22	789,1	–	14,0	12,0	13,0
10./11. III.	8,76	1029,6	3,08	269,8	11,36	995,1	8,28	725,3	–	14,0	12,0	13,0
11./12. III.	8,15	1029,7	3,22	262,4	11,55	941,3	8,33	678,9	440	16,0	14,0	15,0
12./13. III.	7,74	1029,2	2,99	231,4	11,15	863,0	8,16	631,6	–	17,0	14,0	15,5
13./14. III.	8,17	1028,7	3,70	302,3	11,88	970,6	8,18	668,3	–	17,0	15,0	16,0
14./15. III.	7,09	1030,0	3,40	241,1	11,84	839,5	8,44	598,4	444	17,0	15,0	16,0
15./16. III.	7,56	1028,9	3,47	262,3	11,65	880,7	8,18	618,4	453	18,0	14,0	16,0
Im Mittel der letzten 5 Tage:	7,74	1029,3	3,36	259,9	11,62	899,0	8,26	639,1	Im Mittel der ganzen Periode 446,5	—	—	

Tabelle XLII a.

In Versuchsreihe C, Perioden I bis VI im Mittel der Kühe Nr. 3 und 4 verabreichte Mengen an verdaulichem Rohprotein und Stärkewert im Vergleich zu den *Kellner*schen Normen.

Periode	Durchschnittlicher Milchertrag pro 500 kg Lebendgewicht u. Tag	Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag: Nach unseren Ausnutzungsversuchen verabreichte Mengen an		Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag: *Kellner* verlangt bei dem gleichen Milchertrag		Es wurden demnach in Proz. der von *Kellner* verlangten Nährstoffmengen in Wirklichkeit verabreicht	
		verdaulichem Rohprotein	Stärkewert	verdauliches Rohprotein	Stärkewert	verdauliches Rohprotein	Stärkewert
	kg	kg	kg	kg	kg	%	%
I. Grundfutter	13,26	0,39	8,60	2,27	12,25	17,2	70,2
II. Grundfutter + Harnstoff	15,33	1,54	9,48	2,57	13,20	59,9	71,8
III. Grundfutter	11,66	0.41	9,46	1,97	11,25	20,8	84,1
IV. Grundfutter + Harnstoff + Zuckerrüben	12,49	1,62	12,19	2,12	11,75	76,4	103,7
V. Grundfutter + Erdnußkuchen	13,20	1,44	10,78	2,20	12,00	65,5	89,8
VI. Grundfutter	9,97	0,41	9,43	1,75	10,50	23,4	89,8

Tabelle XLII b. In Versuchsreihe C, Perioden III bis VI an Kuh Nr. 1, verabreichte Mengen an verdaulichem Rohprotein und Stärkewert im Vergleich zu den *Kellner*schen Normen.

Periode	Durchschnittlicher Milchertrag pro 500 kg Lebendgewicht u. Tag	Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag: Nach unseren Ausnutzungsversuchen verabreichte Mengen an		*Kellner* verlangt bei dem gleichen Milchertrag		Es wurden demnach in % der von *Kellner* verlangten Nährstoffmengen in Wirklichkeit verabreicht	
	kg	verdaulichem Rohprotein kg	Stärkewert kg	verdauliches Rohprotein kg	Stärkewert kg	verdauliches Rohprotein %	Stärkewert %
III. Grundfutter	10,33	0,43	9,78	1,82	10,75	23,6	91,0
IV. Grundfutter + Harnstoff + Zuckerrüben	10,96	1,45	11,77	1,90	11,00	73,7	107,0
V. Grundfutter + Erdnußkuchen	11,23	1,27	10,72	1,90	11,00	66,8	97,5
VI. Grundfutter	8,67	0,45	9,88	1,55	9,90	29,0	99,8

Versuchsreihe C. Perioden I bis VI im Mittel der Kühe Nr. 3 und 4.

Tabelle XLIII. Vergleich der nach den *Kellner*schen Tabellen berechneten Nährstoffmengen pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag mit den durch Stoffwechselversuche direkt ermittelten.

Periode	Nach den *Kellner*schen Tabellen berechnete Mengen an		Nach den von uns ermittelten Verdauungswerten berechnete Mengen an		Wirklich verabreichte Nährstoffmengen in % der nach *Kellner* berechneten Werte	
	verdaulichem Rohprotein kg	Stärkewert kg	verdaulichem Rohprotein kg	Stärkewert kg	verdauliches Rohprotein %	Stärkewert %
I. Grundfutter	0,76	9,40	0,39	8,59	51,3	91,4
II. Grundfutter + Harnstoff	1,81	9,87	1,54	9,48	85,1	96,1
III. Grundfutter	0,79	10,11	0,41	9,46	51,9	93,6
IV. Grundfutter + Harnstoff + Zuckerrüben	1,89	12,03	1,62	12,19	85,7	101,3
V. Grundfutter + Erdnußkuchen	1,91	12,14	1,44	10,78	75,4	88,8
VI. Grundfutter	0,79	10,27	0,41	9,43	51,9	91,8
Perioden III bis VI an der Kuh Nr. 1.						
III. Grundfutter	0,82	10,69	0,43	9,78	52,4	91,5
IV. Grundfutter + Harnstoff + Zuckerrüben	1,74	12,27	1,45	11,77	83,3	95,9
V. Grundfutter + Erdnußkuchen	1,71	12,00	1,33	10,72	77,8	89,3
VI. Grundfutter	0,83	10,75	0,45	9,88	54,2	91,9

Die vorstehenden Tabellen Nr. XLII a und b über den Futterverzehr erweisen, daß die Tagesgaben größtenteils wesentlich niedriger waren, als *Kellner* verlangt; besonders gilt das für das verdauliche Rohprotein. In den Grundfutterperioden erhielten die 3 Kühe nur 17,2—29% des nach *Kellner* erforderlichen verdaulichen Rohproteins, im Höchstfalle (Periode IV an den Kühen 3 u. 4) enthielt die Ration 76,4% der verlangten Menge. Höher war der Gehalt der Rationen an Stärkewert; im Minimum wurden 70,2% (Grundfutterperiode I an den Kühen 3 u. 4) verabreicht, im Höchstfalle (Periode IV an der Kuh Nr. 1) 107%. Die Berechnung des Gehalts der Rationen an verdaulichem Rohprotein und Stärkewert erfolgte, wie aus den Tabellen XLII a und b ersichtlich, mit Hilfe der direkt bestimmten Verdauungswerte und nicht nach den Durchschnittszahlen der Futtertabellen. Wie notwendig die direkte Feststellung des verdaulichen Anteils der Futtermittel war, erhellt aus der vorstehenden Tabelle XLIII. Wir ersehen aus derselben, daß z. B. in den Grundfutterperioden nur etwa die Hälfte derjenigen Menge an verdaulichem Rohprotein verfüttert worden war, die sich rechnerisch aus den mittleren Verdauungswerten nach *Kellner* ergibt.

Wenn wir zunächst die Höhe der Milcherträge in den Grundfutterperioden I, III und VI betrachten, so ist bei sämtlichen 3 Kühen ein starker Abfall der Milchleistung festzustellen; die betreffenden Zahlen sind im Durchschnitt pro Kopf und Tag:

	Für Kuh Nr. 3 u. 4 Milchmenge im Mittel kg	Für Kuh Nr. 1 Milchmenge kg
Grundfutterperiode I	10,16	—
„ III	8,52	9,10
„ VI	7,32	7,74

Dieser starke Abfall der Milchsekretion ist natürlich hauptsächlich eine Folge der unzureichenden Zufuhr an verdaulichen Nährstoffen und insbesondere an verdaulichem Rohprotein. Betrachten wir nun den Effekt der in der Periode II gereichten Harnstoffgaben von 150 g auf die Milchleistung, so ergibt sich im Mittel der beiden Kühe eine Erhöhung der Milchmenge im Vergleich zu der Grundfutterperiode I von 10,16 auf 11,16 kg und der Milchtrockensubstanz von 1173 auf 1279 g. Im Vergleich zu dem Mittel aus beiden Grundfutterperioden I und III wurden aus 150 g Harnstoff 1,82 kg Milch und 213,2 g Milchtrockensubstanz erzielt, das würde einem Milchertrag von 12,1 kg und einem Milchtrockensubstanzertrag von 1421 g aus 1 kg Harnstoff entsprechen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen an der Kuh Nr. 5, Versuchsreihe A, hat hiernach der Harnstoff eine starke Wirkung auf die Milchleistung gehabt.

Fortsetzung auf S. 378.

Tabelle XLIV.

Durchschnittliche Erträge an Milch und Milchbestandteilen in den Perioden I bis VI, Versuchsreihe C im Mittel von Kuh 3 und 4.

Periode	Milchmenge	Trockensubstanz		Asche		Organische Substanz		Protein (N · 6,25)		Fett		Milchzucker u. andere N-freie organ. Stoffe	
	kg	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g
I. Grundfutter	10,16	11,54	1172,7	0,69	70,1	10,85	1102,6	2,52	256,0	2,96	301,1	5,37	545,5
II. Grundfutter + Harnstoff	11,16	11,46	1278,8	0,69	77,0	10,77	1201,8	2,60	290,2	2,96	330,7	5,21	580,9
III. Grundfutter	8,52	11,24	958,4	0,70	59,7	10,54	898,7	2,45	208,7	2,79	237,8	5,30	452,2
IV. Grundfutter + Rüben + Harnstoff	9,12	11,54	1052,5	0,68	62,0	10,86	990,5	2,35	214,3	3,09	281,8	5,42	494,4
V. Grundfutter + Erdnußkuchen	9,52	11,60	1104,4	0,70	66,6	10,90	1037,8	2,57	244,7	3,03	288,1	5,30	505,0
VI. Grundfutter	7,32	11,11	813,0	0,70	51,2	10,41	761,8	2,43	177,9	2,70	198,0	5,28	385,9
Erträge an Milch und Milchbestandteilen aus dem Grundfutter in den Hauptperioden II, IV und V.													
II.	9,34	11,41	1065,6	0,70	64,9	10,71	1000,7	2,49	232,3	2,88	269,5	5,34	498,9
IV.	8,09	11,21	906,7	0,70	56,7	10,51	850,0	2,45	197,8	2,76	223,6	5,30	428,6
V.	7,70	11,17	859,8	0,70	53,9	10,47	805,9	2,44	187,8	2,74	210,8	5,29	407,3

Tabelle XLV.

Durchschnittliche Erträge an Milch und Milchbestandteilen in Versuchsreihe C, Perioden III bis VI an der Kuh Nr. 1.

Periode	Milchmenge	Trockensubstanz		Asche		Organische Substanz		Protein (N · 6,25)		Fett		Milchzucker u. andere N-freie organ. Stoffe	
	kg	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g
III. Grundfutter	9,10	11,16	1015,5	0,70	63,7	10,46	951,8	2,42	220,2	3,04	276,6	5,00	455,0
IV. Grundfutter + Harnstoff + Rüben	9,66	11,23	1084,6	0,73	70,5	10,50	1014,1	2,40	231,8	3,04	293,2	5,06	489,1
V. Grundfutter + Erdnußkuchen	10,10	11,87	1199,0	0,74	74,7	11,13	1124,3	2,86	288,9	3,52	355,7	4,75	479,7
VI. Grundfutter	7,74	11,62	899,0	0,73	56,5	10,89	842,5	2,73	211,3	3,36	259,9	4,80	371,3
Erträge an Milch und Milchbestandteilen aus dem Grundfutter*) in den Hauptperioden IV und V.													
IV.	8,59	11,31	971,8	0,71	61,0	10,60	910,8	2,52	216,9	3,15	270,3	4,93	423,6
V.	8,13	11,47	932,3	0,72	58,6	10,75	873,7	2,63	213,8	3,26	264,7	4,86	395,2

*) Über die Berechnung vergleiche S. 334. Der Gesamtunterschied von der Mitte der Periode III zur Mitte der Periode VI betrug in diesem Falle 28 Tage, der Teilunterschied von Mitte III zu Mitte IV 10,5 Tage = 37,5% des Gesamtunterschiedes (von den Werten für Periode III zu subtrahieren), der Teilunterschied von Mitte V bis Mitte VI 8,0 Tage = 28,6% des Gesamtunterschiedes (zu den Werten für Periode VI zu addieren).

Tabelle XLVI.

Mehrerträge an Milch und Milchbestandteilen durch die Zulagen in den Hauptperioden II, IV und V im Mittel von Kuh Nr. 3 und 4.

Milchertrag aus	Milchmenge	Trockensubstanz		Asche		Organische Substanz		Protein		Fett		Milchzucker u. andere N-freie organ. Stoffe	
	kg	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g
Periode II. Harnstoff.													
Grundfutter + Harnstoff	11,16	11,46	1278,8	0,69	77,0	10,77	1201,8	2,60	290,2	2,96	330,7	5,21	580,9
Grundfutter allein	9,34	11,41	1065,6	0,70	64,9	10,71	1000,7	2,49	232,3	2,88	269,5	5,34	498,9
Aus 150 g Harnstoff	1,82	11,71	213,2	0,66	12,1	11,05	201,1	3,18	57,9	3,36	61,2	4,51	82,0
Aus 1 kg Harnstoff	12,13	**1421,4**		**80,7**		1340,7		386,0		408,0		546,7	
Periode IV. Harnstoff und Zuckerrüben.													
Grundfutter + Harnstoff + Zuckerrüben	9,12	11,54	1052,5	0,68	62,0	10,86	990,5	2,35	214,3	3,09	281,6	5,42	494,4
Grundfutter allein	8,09	11,21	906,7	0,70	56,7	10,51	850,0	2,45	197,8	2,76	223,6	5,30	428,6
Aus 150 g Harnstoff + 3,81 kg Zuckerrüben	1,03	14,15	145,8	0,51	5,3	13,64	140,5	1,60	16,5	5,65	58,2	6,39	65,8
Aus 171,0 g Harnstoff + 4,34 kg Zuckerrüben	**1,17**	14,20	**166,2**	0,51	**6,0**	13,69	**160,2**	1,61	**18,8**	5,67	**66,4**	6,41	**75,0**
In Prozenten des Ertrages von 1 kg Erdnußkuchen . . . %	56,3	59,6		41,4		60,6		29,0		75,4		67,3	
Periode V. Erdnußkuchen.													
Grundfutter + Erdnußkuchen	9,52	11,60	1104,4	0,70	66,6	10,90	1037,8	2,57	244,7	3,03	288,1	5,30	505,0
Grundfutter allein	7,70	11,17	859,8	0,70	53,9	10,47	805,9	2,44	187,8	2,74	210,8	5,29	407,3
Aus 0,877 kg Erdnußkuchen	1,82	13,44	244,6	0,70	12,7	12,74	231,9	3,12	56,9	4,25	77,3	5,37	97,7
Aus 1,0 kg Erdnußkuchen	**2,08**	13,41	**278,9**	0,70	**14,5**	12,71	**264,4**	3,12	**64,9**	4,24	**88,1**	5,35	**111,4**

Tabelle XLVII.

Mehrerträge an Milch und Milchbestandteilen durch die Zulagen in den Hauptperioden IV und V (Kuh Nr. 1).

Milchertrag aus	Milchmenge	Trockensubstanz		Asche		Organische Substanz		Protein		Fett		Milchzucker u. andere N-freie organ. Stoffe	
	kg	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g
Periode IV. Harnstoff und Zuckerrüben.													
Grundfutter + Harnstoff + Zuckerrüben	9,66	11,23	1084,6	0,73	70,5	10,50	1014,1	2,40	231,8	3,04	293,2	5,06	489,1
Grundfutter allein	8,59	11,31	971,8	0,71	61,0	10,60	910,8	2,52	216,9	3,15	270,3	**4,93**	423,6
Aus 150 g Harnstoff + 3,81 kg Zuckerrüben	1,07	10,54	112,8	0,89	9,5	9,65	103,3	1,39	14,9	**2,14**	22,9	**6,12**	65,5
Aus 171,0 g Harnstoff + 4,34 kg Zuckerrüben*)	**1,22**	10,54	**128,6**	0,89	**10,8**	9,65	**117,8**	1,39	**17,0**	**2,14**	**26,1**	6,12	**74,7**
In Prozenten des Ertrages von 1 kg Erdnußkuchen %	54,2	42,3		59,7		41,2		19,9		25,1		77,6	
Periode V. Erdnußkuchen.													
Grundfutter + Erdnußkuchen	10,10	11,87	1199,0	0,74	74,7	11,13	1124,3	2,86	288,9	3,52	355,7	4,75	479,7
Grundfutter allein	**8,13**	11,47	932,3	0,72	58,6	10,75	873,7	2,63	213,8	3,26	264,7	**4,86**	395,2
Aus 0,877 kg Erdnußkuchen	1,97	13,54	266,7	0,82	16,1	12,72	250,6	3,81	75,1	4,62	91,0	4,29	84,5
Aus 1,0 kg Erdnußkuchen	**2,25**	13,50	**304,1**	0,80	**18,4**	12,70	**285,7**	**3,81**	**85,6**	4,61	**108,8**	4,28	**96,3**

*) Mit dem gleichen Gehalt an verdaulichem Rohprotein und Stärkewert wie 1 kg Erdnußkuchen.

Was nun den Effekt der Harnstoffgaben im Gemisch mit einem eiweißarmen Futtermittel (Zuckerrüben) im Vergleich zu Erdnußkuchen mit ungefähr demselben Gehalt an verdaulichem Rohprotein und Stärkewert betrifft, so ergibt sich folgendes. Aus 1 kg Erdnußkuchen wurden gewonnen:

	Milchmenge kg	Milchtrockensubstanz g
im Mittel von Kuh Nr. 3 u. 4 . .	2,08	278,9
bei „ „ 1	2,25	304,1

Aus 171 g Harnstoff und 4,34 kg Zuckerrüben wurden erzielt:

	Milchmenge kg	Milchtrockensubstanz g
Bei den Kühen Nr. 3 u. 4 im Mittel	1,17	166,2
Bei Kuh Nr. 1	1,22	128,6

Hiernach wurde in Prozent der durch die Erdnußkuchen erzielten Milcherträge durch Harnstoff und Zuckerrüben mit dem gleichen Nährstoffgehalt gewonnen:

	Milchmenge %	Milchtrockensubstanz %
Im Mittel von Kuh Nr. 3 u. 4 . .	56,3	59,6
bei „ „ 1.	54,2	42,3

Diese Ergebnisse an den 3 Kühen weichen hiernach nicht erheblich voneinander ab, obwohl die schwerere Kuh Nr. 1 in den Hauptperioden zwar absolut die gleichen Kraftfutterzulagen, bezogen auf das Grundfutter, jedoch geringere Zulagen erhalten hatte als die Kühe 3 und 4.

Die Minderwirkung des Harnstoffs in Kombination mit Zuckerrüben im Vergleich zu Erdnußkuchen dürfte im wesentlichen durch 2 Momente bedingt sein. Erstens durch die ungünstige Stellung der Harnstoff-Zuckerrübenperiode IV in der Versuchsreihe; dieser Periode ging eine Grundfutterperiode mit ganz unzureichender Nährstoff- und Stickstoffzufuhr voraus. Während derselben haben die Kühe sicherlich Körpereiweiß für die Milchbildung in Anspruch nehmen müssen, während der folgenden Harnstoff-Zuckerrübenperiode mit stärkerer Stickstoff- und Calorienzufuhr wurde das verlorene Körpereiweiß höchstwahrscheinlich ersetzt — und es konnte hier durch Beigabe der eiweißarmen Rüben besser ersetzt werden als etwa durch Harnstoffgaben allein —,[1] so daß für die Milchbildung weniger Nährstoffe disponibel blieben, als wenn die Kühe in der Vorperiode ausreichende Nährstoffmengen erhalten

hätten. Zweitens: Es ist schon früher darauf hingewiesen worden (l. c.), daß bei stärkeren Harnstoffgaben der Harnstoff nicht vollständig zu Bakterieneiweiß synthetisiert werden dürfte, so daß also ein Bruchteil des Harnstoffs unverändert in den Darm gelangt und resorbiert wird. Der resorbierte Harnstoff ist aber für die Ernährung wertlos. Schließlich käme noch in Betracht, daß die Zuckerrüben für die Milchbildung möglicherweise einen geringeren Wert haben als aus ihrem Stärkewert, der ihrer Ausnutzung für den Fettansatz entspricht, zu schließen wäre. Trotz dieser ungünstigen Versuchsbedingungen ist die Milchsekretion durch Harnstoff- und Zuckerrüben nicht unwesentlich gesteigert worden, wenngleich der Effekt hinter den Erträgen bei ausschließlicher Harnstoffzulage im Grundfutter in Periode II sehr erheblich zurückbleibt. Die betreffenden Zahlen sind für die Kühe Nr. 3 und 4:

	Milchmenge kg	Milchtrockensubstanz g
Durch 1 kg Harnstoff in Periode II	12,13	1421,4
Durch 1 kg Harnstoff und 25,4 kg Zuckerrüben in Periode IV	6,86	972,0
Das sind in Prozent der Erträge von Periode II	56,5%	68,5%

Hiernach haben die Zuckerrüben nicht nur keinen, sondern sogar einen negativen Wert *für die Milchleistung* gehabt, was eben darauf zurückzuführen ist, daß die Kühe in den vorausgegangenen Grundfutterperioden Verluste an Körpersubstanz erlitten, die sie jetzt unter günstigeren Bedingungen für den Ansatz aus den Rüben deckten, so daß für die Milchbildung nichts übrig blieb, während Körpersubstanz ersetzt wurde.

Nachstehend haben wir nach rechnerischer Ausschaltung des Einflusses des Lactationsstadiums die wahrscheinlichen Erträge an Milch und ihren Bestandteilen berechnet. Da die Kuh 1 erst von der Periode III ab eingestellt worden war, sind wir so vorgegangen, daß wir gesondert die wahrscheinlichen Milcherträge für die Perioden III—VI im Mittel der Kühe Nr. 3 und 4 und außerdem der Kuh Nr. 1 ermittelt haben (Tabellen XLVIII u. XLIX), ferner wurden für die Kühe Nr. 3 und 4 die Milcherträge der sämtlichen Perioden I—VI bezogen auf die Ertragszahlen in der Grundfutterperiode I berechnet (Tabelle L). Ein wesentlich anderes Gesicht bekommen die Zahlen durch die Berechnung der wahrscheinlichen Werte allerdings nicht, und wir können daher um so mehr auf eine besondere Besprechung derselben verzichten, als es sich ja um Wahrscheinlichkeitswerte und nicht direkt ermittelte Erträge handelt. Wir haben unsere Schlußfolgerungen stets nur auf letztere aufgebaut.

Tabelle XLVIII.

Mehrerträge an Milch und Milchbestandteilen durch die Zulagen in den Hauptperioden IV und V im Mittel für die Kühe Nr. 3 und 4 nach rechnerischer Ausschaltung des Einflusses der Lactation. Grundfuttererträge auf die Werte für Periode III erhöht.

Milchertrag aus	Milchmenge kg	Trockensubstanz g	Asche g	Organ. Substanz g	Protein g	Fett g	Milchzucker und andere N-freie org. Stoffe g
			Periode IV. Harnstoff + Zuckerrüben.				
Grundfutter + Harnstoff + Zuckerrüben	9,60	1112,5	65,3	1047,2	226,1	299,7	521,4
Grundfutter allein	8,52	958,4	59,7	898,7	208,7	237,8	452,2
Aus 150 g Harnstoff + 3,81 kg Zuckerrüben	1,08	154,1	5,6	148,5	17,4	61,9	69,2
Aus 171,0 g Harnstoff + 4,34 kg Zuckerrüben	1,23	175,7	6,4	169,3	19,8	70,6	78,9
In Prozenten des Ertrages aus 1 kg Erdnußkuchen . . . %	53,7	56,5	39,8	57,4	27,5	71,0	63,9
			Periode V. Erdnußkuchen.				
Grundfutter + Erdnußkuchen	10,53	1231,1	73,8	1157,3	271,9	325,0	560,4
Grundfutter allein	8,52	958,4	59,7	898,7	208,7	237,8	452,2
Aus 0,877 kg Erdnußkuchen	2,01	272,7	14,1	258,6	63,2	87,2	108,2
Aus 1 kg Erdnußkuchen	2,92	311,0	16,1	294,9	72,1	99,4	123,4

Tabelle XLIX.

Mehrerträge an Milch und Milchbestandteilen durch die Zulagen in den Hauptperioden IV und V (Kuh Nr. 1) nach rechnerischer Ausschaltung des Einflusses der Lactation.

Milchertrag aus	Milchmenge kg	Trockensubstanz g	Asche g	Organ. Substanz g	Protein g	Fett g	Milchzucker und andere N-freie org. Stoffe g
			Periode IV. Harnstoff + Zuckerrüben.				
Grundfutter + Harnstoff + Zuckerrüben	10,23	1133,4	73,6	1059,8	235,3	300,0	524,5
Grundfutter allein	9,10	1015,5	63,7	951,8	220,2	276,6	455,0
Aus 150 g Harnstoff + 3,81 kg Zuckerrüben	1,13	117,9	9,9	108,0	15,1	23,4	69,5
Aus 171,0 g Harnstoff + 4,34 kg Zuckerrüben	1,29	134,4	10,3	123,1	17,2	26,7	79,2
In Prozenten des Ertrages aus 1 kg Erdnußkuchen . . . %	51,2	40,6	56,8	39,5	19,5	24,6	69,1
			Periode V. Erdnußkuchen.				
Grundfutter + Erdnußkuchen	11,31	1306,0	81,2	1224,8	297,5	371,7	555,5
Grundfutter allein	9,10	1015,5	63,7	951,8	220,2	276,6	455,0
Aus 0,877 kg Erdnußkuchen	2,21	290,5	17,5	273,0	77,4	95,1	100,5
Aus 1 kg Erdnußkuchen	2,52	331,2	19,9	311,3	88,3	108,4	114,6

Tabelle L.

Mehrerträge an Milch und Milchbestandteilen durch die Zulagen in den Hauptperioden II, IV und V im Mittel von Kuh Nr. 3 und 4 nach rechnerischer Ausschaltung des Einflusses der Lactation. — Grundfuttererträge auf die Werte von Periode I erhöht.

Milchertrag aus	Milchmenge	Trockensubstanz	Asche	Organische Substanz	Protein	Fett	Milchzucker und andere N-freie organ. Stoffe
	kg	g	g	g	g	g	g
Periode II. Harnstoff.							
Grundfutter + Harnstoff	12,14	1407,2	83,2	1324,0	319,8	369,5	634,7
Grundfutter allein	10,16	1172,7	70,1	1102,6	256,0	301,1	545,5
Aus 150 g Harnstoff	1,98	234,5	13,1	221,4	63,8	68,4	89,2
Aus 1 kg Harnstoff	13,20	1563,3	87,3	1476,0	425,3	456,0	594,7
Periode IV. Harnstoff + Zuckerrüben.							
Grundfutter + Harnstoff + Zuckerrüben	11,45	1361,5	76,6	1284,9	277,3	379,5	628,1
Grundfutter allein	10,16	1172,7	70,1	1102,6	256,0	301,1	545,5
Aus 150 g Harnstoff + 3,81 kg Zuckerrüben	1,29	188,8	6,5	182,3	21,3	78,4	82,6
Aus 1,0 kg Harnstoff + 25,4 kg Zuckerrüben	8,60	1258,7	43,3	1215,4	142,0	522,7	550,7
Aus 171,0 g Harnstoff + 4,34 kg Zuckerrüben	1,47	215,3	7,4	207,9	24,3	89,4	94,2
In Prozenten des Ertages aus 1 kg Erdnußkuchen . . . %	53,7	56,6	39,4	57,5	27,5	71,0	63,9
Periode V. Erdnußkuchen.							
Grundfutter + Erdnußkuchen	12,56	1506,5	86,6	1419,9	333,6	411,5	674,8
Grundfutter allein	10,16	1172,7	70,1	1102,6	256,0	301,1	545,5
Aus 0,877 kg Erdnußkuchen	2,40	333,8	16,5	317,3	77,6	110,4	129,3
Aus 1 kg Erdnußkuchen	2,74	380,6	18,8	361,8	88,5	125,9	147,4

Tabelle LI. Gewichtsveränderungen der Kühe Nr. 3 und 4 während der Perioden I bis III. Versuchsreihe C.

Kuh Nr.	Periode	Dauer Tage	Anfangsgewicht kg	Endgewicht kg	Anzahl der Wägungen	Durchschnittsgewicht aus allen Wägungen kg	Tägliche Gewichtszunahme (+) oder -abnahme (−) kg
3	I. Heu + Zuckerrüben	10	410,0	399,0	2	404,5	−**1,10**
4		10	360,0	363,0	2	361,5	+**0,30**
Im Mittel von 3 und 4		—	385,0	381,0	—	383,0	−**0,40**
3	II. Heu + Zuckerrüben + Harnstoff	15	390,0	369,0	4	379,7	−**1,40**
4		15	360,0	340,0	4	348,0	−**1,33**
Im Mittel von 3 und 4		—	375,0	354,5	—	363,9	−**1,37**
3	III. Heu + Zuckerrüben	10	369,0	390,0	4	384,0	+**2,10**
4		10	340,0	358,0	4	347,8	+**1,80**
Im Mittel von 3 und 4		—	354,5	374,0	—	365,9	+**1,95**

Tabelle LII. Gewichtsveränderungen der Kühe Nr. 1, 3 und 4 während der Perioden III bis VI, Versuchsreihe C.

Kuh Nr.	Periode	Dauer Tage	Anfangsgewicht kg	Endgewicht kg	Anzahl der Wägungen	Durchschnittsgewicht aus allen Wägungen kg	Tägliche Gewichtszunahme (+) oder -abnahme (−) kg
1	III. Grundfutter (Heu + Zuckerrüben)	10	420,0	443,0	4	440,5	+**2,30**
3		10	369,0	390,0	4	384,0	+**2,10**
4		10	340,0	358,0	4	347,8	+**1,80**
Im Mittel von 1, 3 und 4		—	376,3	397,0	—	390,8	+**2,07**
1	IV. Grundfutter + Harnstoff + Zuckerrüben	11	443,0	450,0	4	440,8	+**0,64**
3		11	390,0	377,0	4	381,8	−**1,18**
4		11	358,0	345,0	4	348,3	−**1,18**
Im Mittel von 1, 3 und 4		—	397,0	390,7	—	390,3	−**0,57**
1	V. Grundfutter + Erdnußkuchen	8	450,0	449,0	5	449,8	−**0,13**
3		8	377,0	379,0	5	374,2	+**0,25**
4		8	345,0	350,0	5	347,2	+**0,63**
Im Mittel von 1, 3 und 4		—	390,7	392,7	—	390,4	+**0,25**
1	VI. Grundfutter	8	449,0	453,0	4	446,5	+**0,50**
3		10	379,0	393,0	5	384,4	+**1,40**
4		10	350,0	349,0	5	349,8	−**0,10**
Im Mittel von 1, 3 und 4		—	392,7	398,3	—	393,6	+**0,60**

Bezüglich der in der vorliegenden Versuchsreihe C beobachteten Gewichtsveränderungen ergibt sich im wesentlichen dasselbe Bild wie in der Versuchsreihe A, und wir möchten auf unsere diesbezüglichen Darlegungen auf Seite 342 verweisen. Es unterliegt keinem Zweifel, daß Gewichtsverluste nicht eingetreten wären, wenn wir statt des sehr schlechten Heues mit zirka 50% minderwertigen Pflanzen ein gutes Wiesenheu hätten verfüttern können.

Versuchsreihe D an den Kühen Nr. 2, 3 und 4.

An den Kühen Nr. 2 und 3 wurden die üblichen genauen Feststellungen bezüglich der Nährstoffzufuhr und der Erträge an Milch und ihren Bestandteilen gemacht. Die Kuh Nr. 4, welche nur 75% der von der ungefähr gleichschweren Kuh Nr. 3 verzehrten Ration erhielt, diente mit Ausnahme der abschließenden Grundfutterperiode IV a zu Bilanzversuchen. Die Versuchsreihe D setzt sich für die Kühe Nr. 2 u. 3 aus 5 Perioden zusammen, die in nachstehender Reihenfolge durchgeführt wurden:

Periode I: Grundfutter (Wiesenheu, eingesäuerte Zuckerrüben und Salze);
„ II: Grundfutter + Erdnußkuchen;
„ III: Grundfutter + Kartoffelflocken und Harnstoff.

Die Kartoffelflocken-Harnstoffzulage enthielt rechnerisch ungefähr den gleichen Gehalt an verdaulichem Rohprotein und Stärkewert wie die Erdnußkuchenzulage in Periode II.

Die Berechnung ergab nämlich folgendes:

1 kg Erdnußkuchen enthielt 0,46 kg verdauliches Rohprotein und 0,76 kg Stärkewert,
1,02 kg Kartoffelflocken = 0,02 kg verdauliches Rohprotein und 0,76 kg Stärkewert,
0,1777 kg Harnstoff entsprechen 0,44 kg verdaulichem Rohprotein.

Periode IV: Grundfutter + Kartoffelflocken.

Es wurde die gleiche Menge Kartoffelflocken gegeben wie in der vorausgegangenen Periode III, um den Effekt dieses eiweißarmen Futtermittels allein auf die Milchsekretion zu studieren.

Periode V: Grundfutter.

Die chemische Zusammensetzung der Futtermittel ist aus der Tabelle LIII ersichtlich.

Die Berechnung des Gehalts der Rationen an verdaulichen Nährstoffen erfolgte auf Grund der direkten Feststellungen an der Kuh Nr. 4; daher lassen wir zunächst die Ergebnisse der Bilanzversuche an derselben folgen.

Bilanzversuche an der Kuh Nr. 4.

Es gelangten die folgenden Stoffwechselversuche zur Durchführung:

Periode I: Grundfutter (Wiesenheu, eingesäuerte Zuckerrüben und Salze).
„ II: Grundfutter + Erdnußkuchen.
„ III: Grundfutter + Kartoffelflocken und Harnstoff.
„ IV a: Grundfutter (ohne Bilanzversuch).
„ IV b: Grundfutter + Harnstoff allein.

Zunächst wurde 4 Tage lang versucht, der Kuh Nr. 4 die gleiche Ration beizubringen wie der Kuh Nr. 3; infolge geringerer Freßlust und Isolierung des Tieres ließ die Kuh einen Teil der Ration übrig, und wir entschlossen uns daher, dieselbe auf 75% zu reduzieren. Diese Gaben wurden während der ganzen Dauer der Versuchsreihe restlos

Tabelle LIII.

Zusammensetzung der neu hinzukommenden Futtermittel für die Versuchsreihe D. (Zusammensetzung von Heu, Erdnußkuchen und Harnstoff siehe Tabelle XXI, Seite 345.)

	Eingesäuerte Zuckerrüben							Wiesenheu für den Stoffwechselversuch IVb an Kuh Nr. 4	Kartoffelflocken
	Vom 11./12. IV. bis 24./25. IV. 1921 %	Vom 25./26. IV. bis 6./7. V. 1921 %	Vom 7./8. V. bis 27./28. V. 1921 %	Vom 28./29. V. bis 8./9. VI. 1921 %	Vom 9./10. VI. bis 24./25. VI. 1921 %	Vom 25./26. VI. bis 3./4. VII. 1921 %	Vom 16. VIII. bis 8. IX. 1921 %	%	%
Wasserfreie Substanz	21,12	21,62	20,00	22,28	21,93	22,96	19,80	88,84	87,04
Asche	1,58	1,54	1,74	1,62	2,51	2,35	2,11	6,84	2,93
Organische Substanz	19,54	20,08	18,26	20,66	19,42	20,61	17,69	82,00	84,11
Rohprotein	1,46	1,59	1,70	1,72	1,77	1,75	1,46	7,35	6,24
Reineiweiß	0,91	0,99	1,00	1,01	0,72	0,71	0,56	6,89	3,98
Amide	0,55	0,60	0,70	0,71	1,05	1,04	0,90	0,46	2,26
Rohfett	0,11	0,11	0,11	0,11	0,09	0,09	0,04	1,56	0,23
Rohfaser	1,40	1,44	1,27	1,44	1,69	1,77	1,14	29,09	0,76
N-freie Extraktstoffe	16,57	16,94	15,18	17,39	15,87	17,00	15,05	44,00	76,88
Gesamtsäure	3,46	3,46	5,04*)	5,04*)	2,99	2,99	4,77	—	—
Milchsäure	2,74	2,74	3,26	3,26	2,34	2,34	3,44	—	—
Freie flüchtige Säuren	0,41	0,41	0,95	0,95	0,36	0,36	0,73	—	—
Gebundene flücht. Säuren	0,31	0,31	0,83	0,83	0,29	0,29	0,60	—	—
Ammoniak	0,015	0,015	0,02	0,02	0,03	0,03	0,025	—	—
Alkohol	1,80	1,80	1,91	1,91	1,11	1,11	2,72	—	—

*) Der Säuregehalt der eingesäuerten Zuckerrüben ist hier mit 5,04% außergewöhnlich hoch. Die 3 Kühe Nr. 2, 3 und 4 erhielten in den Tagesgaben pro 1000 kg Lebendgewicht rund 1,6 kg Säure. Hierdurch wird eine gewisse Verdauungsdepression der Nährstoffe eingetreten sein, da nach früheren Versuchen an Schafen von uns (Landw. Jahrbücher **45**, 431. 1913) bei einer Gabe von 1,35 kg Milchsäure pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag durch je 100 g Milchsäure rund 18 g verdauliches Rohprotein und rund 49 g organische Substanz der Verdauung entzogen wurden.

verzehrt. Nach Durchführung einer Vorfütterung wurden täglich außer der Milch Harn und Kot für die Analyse gesammelt. Die Dauer der Vorfütterung war bei Periode I 13 Tage, bei Periode II 12 Tage, bei Periode III 18 Tage und bei Periode IVb 9 Tage. Im Anschluß teilen wir die Ergebnisse der 4 Ausnutzungsversuche mit.

Periode I. Grundfutter (Wiesenheu + eingesäuerte Zuckerrüben) vom 15./16. April bis 5./6. Mai 1921. Versuchstier: Kuh Nr. 4.

Die Vorfütterung dauerte 13 Tage, der Hauptversuch 8 Tage.
Das Tier verzehrte täglich:

4,02 kg	Wiesenheu mit	3436,0 g Trockensubstanz und	47,94 g N
8,85 „	eingesäuerte Zuckerrüben mit	1913,3 g „	„ 22,51 g N
106 g	Salze	105,1 g	
	Sa.	5454,4 g Trockensubstanz und	70,45 g N

Tabelle LIV.

Stickstoffbilanzen, Lebendgewichte und Kotgewichte.

Datum 1921	Stickstoffausscheidung im Harn g	im Harn % der Zufuhr	im Kot g	im Kot % der Zufuhr	Summa g	Summa % der Zufuhr	N-Ansatz g	N-Ansatz % der Zufuhr	Gewicht des Tieres kg	Gewicht d. frischen Kotes kg
28./29. IV.	Harnverluste		46.51	66.0	—	—	—	—	305*)	14.[illegible]
29./30. IV.	15,61	22,2	46.51	66,0	62.12	88,2	8.33	11,8	—	11.15
30.IV. 1.V.	17,69	25,1	46,51	66.0	64.20	91,1	6,25	8,9	—	10.85
1./2. V.	22.46	31,9	46.51	66,0	68.97	97,9	1,48	2,1	—	12.75
2./3. V.	23,18	32,9	46,51	66,0	69.69	98,9	0.76	1,1	—	12.55
3./4. V.	20,06	28.5	46.51	66.0	66,57	94,5	3,88	5.5	—	13.90
4./5. V.	19.10	27.1	46,51	66.0	65.61	93,1	4,84	6,9	—	11.05
5./6. V.	18,96	26,9	46,51	66,0	65,47	92,9	4,98	7,1	307	14.6[illegible]
Im Mittel:	19.58	27.8	46,51	66.0	66,09	93.8	4.36	6,2	306	12.61

*) Vor Beginn der Vorfütterung am 14. April wog die vom 8. III.—15. IV. stark und ohne genaue Bestimmung des Futterverzehrs ernährte Kuh 340 kg. Bei der sehr knappen Fütterung während der vorliegenden Periode waren daher starke Gewichtsabnahmen zu erwarten, die auch bis zum 28. April eintraten.

Das Rohprotein wurde also zu 34,0 % resorbiert. Pro Kilo Lebendgewicht und Tag erhielt das Tier 0,230 g Stickstoff bezw. 0,078 g resorbierbaren Stickstoff oder 0,488 g resorbierbares Rohprotein. Die tägliche Gewichtsabnahme betrug im Mittel 1,5 kg.

In der mittleren täglichen Milchmenge von 4,85 kg, mit 0,413 % Stickstoff wurden 20,02 g Stickstoff = 28,4 % der Zufuhr ausgeschieden. Die Gesamtausscheidung an N in Harn, Kot und Milch betrug 86,11 g. Für die Milchbildung mußten also 15,66 g Stickstoff = 22,2 % der Zufuhr vom Körper hergegeben werden.

Wir wollen versuchen aus den vorstehenden Stickstoffbilanzen das Eiweißminimum für die Kuh unter der Voraussetzung zu berechnen, daß sie trocken steht. Nach den Kopenhagener Versuchen[1]) gelang es, bei trockenstehenden Kühen bei einer Zufuhr von 0,2—0,25 kg verdaulichem Rohprotein pro 1000 kg Lebendgewicht das Stickstoffgleichgewicht zu erzielen.

Bei dem vorstehenden Versuch erhielt die Kuh im Futter 70,45 g Stickstoff; hiervon sind in Abzug zu bringen: 46,51 g Kotstickstoff, 3,40 g Betainstickstoff[2]) und 4,36 g angesetzter Stickstoff, in Summa 54,27 g N. Hieraus errechnet sich ein Erhaltungsbedarf von 16,18 g resorbierbarem Stickstoff pro Kopf bzw. 0,33 kg verdaulichem Rohprotein pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag. Nun sezernierte die Kuh

[1]) 63. Beretning fra den Kgl. Vet. og Landbohojskoles Lab. for Lndök. Forzög. 1907, S. 28 u. 30, zit. nach *O. Kellner*, Lehrbuch, 7. Aufl. S. 145.

[2]) Nach *F. Ehrlich* ist ungefähr 40% des Amidstickstoffs der Zuckerrübe Betainstickstoff, der nach Versuchen des einen von uns auch von Wiederkäuern nicht verwertet werden kann.

durchschnittlich täglich 20,02 g N in der Milch; diese Menge abzüglich der ohne Berücksichtigung des Milchstickstoffs retinierten N-Menge von 4,36 g, also 15,66 g N, mußte die Kuh aus ihrem Körperbestande bestreiten. Voraussetzung für die Richtigkeit der vorstehenden Berechnung des Erhaltungsbedarfes wäre die allerdings nicht zutreffende Annahme, daß das für die Milchbildung benötigte Eiweiß ohne Verlust zu Milcheiweiß wird. Für den vorliegenden Versuch, in dem die Milchbildung zum größten Teil aus dem Körperbestande bestritten werden mußte, dürfte das im wesentlichen zutreffen; das verdauliche Futtereiweiß kann natürlich nicht ohne gewisse Verluste, deren Umfang je nach der Größe der Milchsekretion, dem Lactationsstadium usw. erheblichen Schwankungen unterworfen ist, für die Milchbildung verwertet werden. Durch einen höheren Energiegehalt des Futters hätte übrigens der von uns gefundene minimale Erhaltungsbedarf zweifellos noch etwas erniedrigt werden können, so daß eine Annäherung an die Werte der Kopenhagener Forscher stattgefunden hätte.

Der in der vorliegenden Periode I im Mittel pro Tag produzierte Kot wog lufttrocken 2406,5 g und enthielt in Prozenten:

Trockensubstanz %	Asche %	Organ. Substanz %	Rohprotein %	Reineiweiß %	Amide %	Rohfett %	Rohfaser %	N-freie Extraktstoffe %
87.71	12,23	75,48	12,08	7,33	4,75	3,23	19,32	40,85

Hieraus ergibt sich der folgende Gehalt an Einzelbestandteilen in g pro Tag:

Lufttr. Kot g	Trockensubstanz g	Asche g	Org. Substanz g	Rohprotein g	Reineiweiß g	Amide g	Rohfett g	Rohfaser g	N-freie Extraktst. g
2406,5	2110,6	294,3	1816,5	290,7	176,4	114,3	77,7	465,0	983,1

Die folgende Tabelle enthält die Verdauungswerte für die Nährstoffe des in der vorliegenden Periode verzehrten Futters.

Tabelle LV.

	Trockensubstanz g	Organ. Substanz g	Rohprotein g	Reineiweiß g	Amide g	Rohfett g	Rohfaser g	N-freie Extraktstoffe g
4,02 kg Wiesenheu.	3436,0	3192,4	299,6	272,8	26,8	67,4	1044,5	1780,9
8,85 kg eingesäuerte Zuckerrüben . .	1913,3	1777,0	140,7	87,6	53,1	9,7	127,4	1499,2
106 g Salze. . . .	105,1	—	—	—	—	—	—	—
Im Futter Sa. . .	5454,4	4969,4	440,3	360,4	79,9	77,1	1171,9	3280,1
Der **Kot enthielt** .	2110,8	1816,5	290,7	176,4	114,3	77,7	465,0	983.1
Also resorbiert g	3343,6	3152,9	149,6	184,0	−34,4	−0,6	706,9	2297,0
Also resorbiert %	—	**63,4**	**34,0**	**51,1**	**−43,1**	**−7,8**	**60,4**	**70,0**

In den einzelnen Futtermitteln waren enthalten:

	Verdauliches Rohprotein kg	Stärkewert kg
Im Heu	0,048	0,947
In den Zuckerrüben	0,080 *)	1.180
Pro Kopf Sa..	0,128	2,127
Pro 1000 kg Lebendgewicht	0,42	6,95

*) Nach Abzug des für die Ernährung wertlosen Betains (40 % der Amidstoffe der Zuckerrüben).

Die Verdauungswerte für das Rohprotein und das Reineiweiß in der Grundfutterperiode I sind scheinbar widersinnig. Es wurden nämlich 184 g Reineiweiß, dagegen nur 149,6 g Rohprotein verdaut. Dieses Ergebnis kann nur dadurch zustande gekommen sein, daß der Darm stickstoffhaltige Stoffe nicht eiweißartiger Natur sezernierte, wodurch der Amidgehalt des Kotes entsprechend erhöht wurde. Ähnliche Ergebnisse haben wir bei früheren Versuchen schon wiederholt beobachtet. Die scheinbar negative Verdaulichkeit des Rohfettes erklärt sich aus dem Gehalt des Kotes an ätherlöslichem Nichtfett (Gallensekrete usw.).

Periode II. Grundfutter + Erdnußkuchen vom 6./7. Mai bis 25./26. Mai 1921. Versuchstier: Kuh Nr. 4.

Die Vorfütterung dauerte 12 Tage, der Hauptversuch 8 Tage.
Das Tier verzehrte täglich als Grundfutter:

3.98 kg Wiesenheu mit . . . . . . 3436.0 g Trockensubstanz und 47,94 g N
8,85 kg eingesäuerte Zuckerrüben mit 1770,0 g „ „ 24,08 g N
und 106 g Salzgemisch mit . . . . 105,1 g
als Zulage:
589.5 g Erdnußkuchen mit . . . . . 533,1 g „ „ 48,13 g N
Sa. 5844,2 g Trockensubstanz und 120.15 g N

Tabelle LVI.

Stickstoffbilanzen, Lebendgewichte und Kotgewichte.

Datum 1921	Stickstoffausscheidung im Harn g	% der Zufuhr	im Kot g	% der Zufuhr	Summa g	% der Zufuhr	N-Ansatz g	% der Zufuhr	Gewicht des Tieres kg	Gewicht d. frisch. Kotes kg
18./19.V.	40 67	33,9	55,64	46.3	96,31	80,2	23,84	19,8	310	11.4
19./20.V.	52,02	43,3	55,64	46,3	107,66	89.6	12,49	10,4	—	12.85
20./21.V.	56,06	46,7	55,64	46,3	111,70	93,0	8,45	7,0	—	12,35
21./22.V.	48,74	40,6	55.64	46,3	104,38	86,9	15,77	13,1	—	11.3
22./23.V.	65,96	54.9	55,64	46.3	121,60	101,2	−1,45	−1,2	—	12.6
23./24.V.	—	—	55.64	46,3	—	—	—	—	—	12,7
24./25.V.	50,40	42.0	55.64	46,3	106,04	88,3	14,11	11,7	—	12,3
25./26.V.	44.42	37,0	55.64	46,3	100,06	83,3	20,09	16,7	315	11,4
Im Mittel	51,18	42,6	55,64	46,3	106,82	88,9	13,33	11,1	312,5	12,1

Das Rohprotein wurde also zu 53,7 % resorbiert.

Pro Kilo Lebendgewicht und Tag erhielt das Tier 0,384 g Stickstoff bzw. 0,206 g resorbierbaren Stickstoff oder 1,290 g resorbierbares Rohprotein. Die tägliche Gewichtszunahme betrug im Mittel der 20 tägigen Periode 400 g. In der mittleren täglichen Milchmenge von 4,82 kg mit 0,418 % Stickstoff wurden 20,13 g Stickstoff = 16,7 % der Zufuhr ausgeschieden. Die Gesamtausscheidung an N in Harn, Kot und Milch betrug 126,95 g. Für die Milchbildung mußten also 6,80 g Stickstoff = 5,7% der Zufuhr vom Körper hergegeben werden.

Der in der vorliegenden Periode II produzierte Kot wog im Mittel pro Tag lufttrocken 2691,3 g und enthielt in Prozenten:

Trockensubstanz %	Asche %	Organ. Substanz %	Rohprotein %	Reineiweiß %	Amide %	Rohfett %	Rohfaser %	N-freie Extraktstoff. %
88,08	15,82	72,26	12,92	9,71	3,21	3,96	17,22	38,16

Hieraus ergibt sich der folgende Gehalt an Einzelbestandteilen in g pro Tag:

Lufttr. Kot g	Trockensubstanz g	Asche g	Organ. Substanz g	Rohprotein g	Reineiweiß g	Amide g	Rohfett g	Rohfaser g	N-freie Extraktst. g
2691,3	2370,5	425,8	1944,7	347,7	261,3	86,4	106,6	463,4	1027,0

Die folgende Tabelle enthält die Verdauungswerte für die Nährstoffe des in der vorliegenden Periode verzehrten Futters:

Tabelle LVII.

	Trockensubstanz g	Organ. Substanz g	Rohprotein g	Reineiweiß g	Amide g	Rohfett g	Rohfaser g	N-fr. Extraktst. g
4,02 kg Wiesenheu	3436,0	3192,4	299,6	272,8	26,8	67,4	1044,5	1780,9
8,85 kg eingesäuerte Zuckerrüben	1770,0	1616,0	150,5	88,5	62,0	9,7	112,4	1343,4
589,5 g Erdnußkuch.	533,1	497,1	300,8	272,6	28,2	34,8	22,3	139,2
106 g Salze	105,1	—	—	—	—	—	—	—
Im Futter Sa.	5844,2	5305,5	750,9	633,9	117,0	111,9	1179,2	3263,5
Der Kot enthielt	2370,5	1944,7	347,7	261,3	86,4	106,6	463,4	1027,0
Also resorbiert g	3473,7	3360,8	403,2	372,6	30,6	5,3	715,8	2236,5
Also resorbiert %	—	**63,4**	**53,7**	**58,8**	**26,2**	**4,7**	**60,8**	**68,5**

	Verdauliches Rohprotein kg	Stärkewert kg
Im Heu	0,048	0,947
In den Zuckerrüben	0,084	1,093
In dem Erdnußkuchen	0,246	0,329
Sa.	0,378	2,369
Pro 1000 kg Lebendgewicht	1,21	7,58

Periode III. Grundfutter + Kartoffelflocken + Harnstoff vom 26./27. Mai bis 19./20. Juni 1921. Versuchstier: Kuh Nr. 4.

Die Vorfütterung dauerte 18 Tage, der Hauptversuch 7 Tage.
Das Tier verzehrte täglich als Grundfutter:

3,94 kg Wiesenheu	mit 3436,0 g	Trockensubstanz und	47,94 g N
8,85 kg eingesäuerte Zuckerrüben	„ 1940,8 g	„ „	25,06 g N
106 g Salze	105,1 g		
als Zulage:			
601,5 g Kartoffelflocken mit	523,5 g	„ „	6,00 g N
104,7 g Harnstoff mit	104,6 g	„ „	48,91 g N
	Sa. 6110,0 g	Trockensubstanz und	127,91 g N

Tabelle LVIII. Stickstoffbilanzen, Lebendgewichte und Kotgewichte.

Datum 1921	Stickstoffausscheidung im Harn g	im Harn % der Zufuhr	im Kot g	im Kot % der Zufuhr	Summa g	Summa % der Zufuhr	N-Ansatz g	N-Ansatz % der Zufuhr	Gew. des Tieres kg	Gew. d. frischen Kotes kg
13./14.VI.	54,96	43,0	54,29	42,4	109,25	85,4	18,66	14,6	300	9,0
14./15.VI.	57,11	44,7	54,29	42,4	111,40	87,1	16,51	12,9	—	13,6
15./16.VI.	48,36	37,8	54,29	42,4	102,65	80,2	25,26	19,8	—	11,5
16./17.VI.	76,60	59,9	54,29	42,4	130,89	102,3	−2,98	−2,3	—	13,9
17./18.VI.	59,71	46,7	54,29	42,4	114,00	89,1	13,91	10,9	—	13,7
18./19.VI.	60,45	47,3	54,29	42,4	114,74	89,7	13,17	10,3	—	11,6
19./20.VI.	57,30	44,8	54,29	42,4	111,59	87,2	16,32	12,8	310	13,45
Im Mittel	59,21	46,3	54,29	42,4	113,50	88,7	14,41	11,3	305	12,39

Das Rohprotein wurde also zu 57,6 % resorbiert.

Pro Kilo Lebendgewicht und Tag erhielt das Tier 0,419 g Stickstoff bzw. 0,241 g resorbierbaren Stickstoff oder 1,509 g resorbierbares Rohprotein. Die tägliche Gewichtsabnahme betrug im Mittel der 25 tägigen Periode 200 g. In der mittleren täglichen Milchmenge, 3,76 kg mit 0,486 % Stickstoff, wurden 18,29 g Stickstoff = 14,3 % der Zufuhr ausgeschieden. Die Gesamtausscheidung an N in Harn, Kot und Milch betrug 131,79 g. Für die Milchbildung mußten also 3,88 g Stickstoff = 3,0 % der Zufuhr vom Körper hergegeben werden.

Der Stickstoffverlust vom Körper ist hiernach mit 3,88 g pro Tag geringer als in der vorausgegangenen Erdnußkuchenperiode II, während der die Kuh täglich 6,8 g Stickstoff von ihrem Körperbestande verlor. In Anbetracht der Tatsache, daß die Menge des resorbierbaren Stickstoffs in der Harnstoffperiode III um 9,31 g höher war als in der Erdnußkuchenperiode II, hätte man annehmen sollen, daß dieses Plus zur Deckung des Stickstoffbedarfes hätte ausreichen müssen; da dies aber nicht der Fall war, und da der Harn der Harnstoffperiode III im Mittel täglich 8,03 g Stickstoff mehr enthielt als der Harn während der vorausgegangenen Erdnußkuchenperiode, würde eine Minderverwertung des Harnstoffstickstoffs zu folgern sein. Das ist nun auch in der Tat der Fall, wie bereits in der früheren Arbeit des einen von uns an Hammellämmern gefolgert und durch die vorliegenden vergleichenden Untersuchungen über die Verwertung des Harnstoffs mit einem eiweißarmen

Futtermittel im Vergleich zu dem proteinreichen Erdnußkuchen für die. Milchleistung erwiesen ist. Nach den Ergebnissen der Versuchsreihe D wurde, wie wir sehen werden, z. B. die gleiche Nährstoffmenge in Form von Harnstoff und Kartoffelflocken im Vergleich zu Erdnußkuchen nur zu rund $^4/_5$ verwertet. Es wurde eben nicht sämtlicher Harnstoffstickstoff zu Bakterieneiweiß aufgebaut, der Harnstoff gelangte zu einem Bruchteil in den Darm, sein Stickstoff war damit für die Ernährung wertlos und vermehrte den Stickstoffgehalt des Urins. Bei der vorliegenden Harnstoffperiode III betrug die im Vergleich zu der Erdnußkuchenperiode II im Harn mehr sezernierte Stickstoffmenge 8,03 g, entsprechend 16,4% des aufgenommenen Harnstoffstickstoffs. Eine sehr gleichmäßige Verteilung des Harnstoffs in der Futterration und mäßige Tagesgaben von nicht über 150 g pro Kopf würden eine höchstmögliche Verwertung des Harnstoffs gewährleisten.

Der in der vorliegenden Periode III produzierte Kot wog im Mittel pro Tag lufttrocken 2825,7 g und enthielt in Prozenten:

Trockensubstanz %	Asche %	Organ. Substanz %	Rohprotein %	Reineiweiß %	Amide %	Rohfett %	Rohfaser %	N-freie Extraktstoffe %
83,81	17,01	66,80	12,01	8,29	3,72	2,99	17,37	34,43

Hieraus ergibt sich der folgende Gehalt an Einzelbestandteilen in g pro Tag:

Lufttr. Kot g	Trockensubstanz g	Asche g	Organ. Substanz g	Rohprotein g	Reineiweiß g	Amide g	Rohfett g	Rohfaser g	N-freie Extraktstoff. g
2825,7	2368,2	480,6	1887,6	339,3	234,2	105,1	84,5	490,8	973,0

Die folgende Tabelle enthält die Verdauungswerte für die Nährstoffe des in der vorliegenden Periode verzehrten Futters:

Tabelle LIX.

	Trockensubstanz g	Organ. Substanz g	Rohprotein g	Reineiweiß g	Amide g	Rohfett g	Rohfaser g	N-fr. Extraktst. g
3,94 kg Wiesenheu	3436,0	3192,4	299,6	272,8	26,8	67,4	1044,5	1780,9
8,85 kg eingesäuerte Zuckerrüben	1940,8	1718,7	156,6	63,7	92,9	8,0	149,6	1404,5
601,5 g Kartoffelflocken abzüglich 201,1 g N-freie Extraktstoffe	322,4	304,8	37,5	23,9	13,6	1,4	4,6	261,3
104,7 g Harnstoff +	104,6	104,6	305,7	—	305,7	—	—	—
201,1 g N-freie Extraktstoffe a. d. Kartoffeln	201,1	201,1						
106,0 g Salze	105,1	—	—	—	—	—	—	—
Im Futter Sa.	6110,0	5521,6	799,4	360,4	439,0	76,8	1198,7	3446,7
Der Kot enthielt	2368,2	1887,6	339,3	234,2	105,1	84,5	490,8	973,0
Also resorbiert g	3741,8	3634,0	460,1	126,2	333,9	−7,7	707,9	2473,7
Also resorbiert %	—	**65,8**	**57,6**	**35,0**	**76,0**	**−10,0**	**59,1**	**71,8**

In den einzelnen Futtermitteln waren enthalten:

	Verdauliches Rohprotein kg	Stärkewert kg
Im Heu	0,048	0,947
In den Zuckerrüben	0,076*)	1,137
In Harnstoff + Kartoffelflocken	0,299	0,536
Pro Kopf Sa.	0,423	2,620
Pro 1000 kg Lebendgewicht	1,39	8,59

*) Nach Abzug des für die Ernährung wertlosen Betains (40 % der Amidstoffe der Rüben).

Nach dem Abschluß der Periode III wurde die Kuh aus dem Stoffwechselversuch genommen, sie erhielt jedoch genau die gleiche, aus Heu und eingesäuerten Zuckerrüben bestehende Ration wie in der Grundfutterperiode I, und zwar bis zum 4. VII., um den Abfall der Milchsekretion zahlenmäßig zu bestimmen; an diesem Tage betrug das Lebendgewicht 290 kg und demnach die tägliche Gewichtsabnahme 1,54 kg. Da die Kuh durch die lange Versuchsdauer und durch die Ausrüstung mit Kotbeutel und Harntrichter etwas heruntergekommen war, erhielt dieselbe in der Zeit vom 4. VII. bis 16. VIII. (43 Tage) stets bis zur vollen Sättigung Heu, eingesäuerte Zuckerrüben und Kraftfutter (Biertreber und Erdnußkuchen). Das Lebendgewicht stieg infolgedessen auch stark an, und zwar von 290 auf 353 kg bzw. täglich um 1,46 kg. Am 16. VIII. begann die Vorfütterung für die Periode IV b. Das Grundfutter blieb das gleiche wie in den früheren Bilanzversuchen I—III, außerdem wurden 112,5 g Harnstoff pro Tag verabreicht. Im Hinblick auf den ganz unzureichenden Nährstoffgehalt der Ration waren naturgemäß starke Gewichtsabnahmen zu erwarten.

Periode IV b. Grundfutter + Harnstoff vom 16./17. August bis 2./3. September 1921. Versuchstier: Kuh Nr. 4.

Die Vorfütterung dauerte 9 Tage, der Hauptversuch 9 Tage.
Das Tier verzehrte täglich als Grundfutter:

3,87 kg Wiesenheu mit	3436,0 g	Trockensubstanz und	45,49 g N
8,85 kg eingesäuerte Zuckerrüben mit	1752,3 g	„ „	20,78 g N
106 g Salze mit	105,1 g	„	
112,5 g Harnstoff mit	112,4 g	„ „	52,43 g N
Sa.	5405,8 g	Trockensubstanz und	118,70 g N

Tabelle LX. Stickstoffbilanzen, Lebendgewichte und Kotgewichte.

Datum 1921	Stickstoffausscheidung im Harn g	im Harn % der Zufuhr	im Kot g	im Kot % der Zufuhr	Summe g	Summe % der Zufuhr	N-Ansatz g	N-Ansatz % der Zufuhr	Gew. des Tieres kg	Gew. d. frischen Kotes kg
25./26. VIII.	52,19	44,0	48,81	41,1	101,00	85,1	17,70	14,9	335	11,00
26./27. VIII.	60,79	51,2	48,81	41,1	109,60	92,3	9,10	7,7	—	10,70
27./28. VIII.	63,39	53,4	48,81	41,1	112,20	94,5	6,50	5,5	—	10,55
28./29. VIII.	64,60	54,4	48,81	41,1	113,41	95,5	5,29	4,5	—	13,65
29./30. VIII.	69,51	58,6	48,81	41,1	118,32	99,7	0,38	0,3	—	11,85
30./31. VIII.	66,26	55,8	48,81	41,1	115,07	96,9	3,63	3,1	—	12,60
31. VIII./1. IX.	42,70	36,0	48,81	41,1	91,51	77,1	27,19	22,9	—	12,10
1./2. IX.	70,17	59,1	48,81	41,1	118,98	100,2	−0,28	−0,2	—	13,55
2./3. IX.	69,14	58,3	48,81	41,1	117,95	99,4	0,75	0,6	317	11,90
Im Mittel:	62,08	52,3	48,81	41,1	110,89	93,4	7,81	6,6	326	11,99

Das Rohprotein wurde also zu 58,9% resorbiert.

Pro Kilo Lebendgewicht und Tag erhielt das Tier 0,364 g Stickstoff bzw. 0,214 g resorbierbaren Stickstoff oder 1,337 g resorbierbares Rohprotein. Die tägliche Gewichtsabnahme betrug im Mittel der ganzen Periode 2,0 kg, was im Hinblick auf die Ausführungen auf Seite 380 nicht überraschen kann. In der mittleren täglichen Milchmenge von 3,06 kg, mit 0,448% Stickstoff wurden 13,72 g Stickstoff = 11,6% der Zufuhr ausgeschieden. Die Gesamtausscheidung an N in Harn, Kot und Milch betrug 124,61 g. Für die Milchbildung mußten also 5,91 g Stickstoff = 5,0% der Zufuhr vom Körper hergegeben werden.

Der in der vorliegenden Periode IV b produzierte Kot wog im Mittel pro Tag lufttrocken 2735,2 g und enthielt in Prozenten:

Trockensubstanz %	Asche %	Organ. Substanz %	Rohprotein %	Reineiweiß %	Amide %	Rohfett %	Rohfaser %	N-freie Extraktstoffe %
85,23	16,04	69,19	11,15	8,66	2,49	2,62	15,88	39,54

Hieraus ergibt sich der folgende Gehalt an Einzelbestandteilen in g pro Tag:

Lufttr. Kot g	Trockensubstanz g	Asche g	Organ. Substanz g	Rohprotein g	Reineiweiß g	Amide g	Rohfett g	Rohfaser g	N-freie Extraktstoff. g
2735,2	2331,2	438,7	1892,5	305,1	236,9	68,2	71,6	434,3	1081,5

Die folgende Tabelle enthält die Verdauungswerte für die Nährstoffe des in der vorliegenden Periode verzehrten Futters:

Tabelle LXI.

	Trockensubstanz g	Organ. Substanz g	Rohprotein g	Reineiweiß g	Amide g	Rohfett g	Rohfaser g	N-fr. Extraktst. g
3,870 kg Wiesenheu	3436,0	3171,4	284,3	265,2	19,1	60,4	1125,1	1701,6
8,85 kg eingesäuerte Zuckerrüben abzüglich 215,3 g N-freie Extraktstoffe	1537,0	1350,3	129,9	49,6	79,6	3,5	100,9	1116,7
112,5 g Harnstoff	112,4	112,4	327,7	—	327,7	—	—	—
+ 215,3 g N-freie Extraktstoffe aus den eingesäuerten Zuckerrüben	215,3	215,3						
106 g Salze	105,1	—	—	—	—	—	—	—
Im Futter Sa.	5405,8	4849,4	741,9	314,8	426,4	63,9	1226,0	2818,3
Der Kot enthielt	2331,2	1892,5	305,1	236,9	68,2	71,6	434,3	1081,5
Also resorbiert g	3074,6	2956,9	436,8	77,9	358,2	−7,7	791,7	1736,8
Also resorbiert %	—	**61,0**	**58,9**	**24,8**	**84,0**	**−12,0**	**64,6**	**61,6**

Nach Abzug des für die Ernährung wertlosen Betains (40% der Rübenamide) enthielt die Ration:

	Verdauliches Rohprotein kg	Stärkewert kg
Pro Kopf	0,405	2,48
Pro 1000 kg Lebendgewicht	1,24	7,61

Tabelle LXII.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen in der Hauptperiode IVb von der Kuh Nr. 4 (Grundfutter + Harnstoff).

Tag 1921	Milchmenge kg	Spezifisches Gewicht	Fett %	Fett g	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Fettfreie Trockensubstanz %	Fettfreie Trockensubstanz g	Gewicht der Kuh kg
25./26. VIII.	3,39	1029,6	3,38	114,6	11,72	397,3	8,34	282,7	335,0
26./27. VIII.	3,05	1028,7	3,28	100,0	11,37	346,8	8,09	246,8	—
27./28. VIII.	3,24	1030,4	3,35	108,5	11,88	384,9	8,53	276,4	—
28./29. VIII.	2,87	1028,9	3,28	94,2	11,42	327,8	8,14	233,6	—
29./30. VIII.	2,82	1029,0	3,52	99,3	11,74	331,1	8,22	231,8	—
30./31. VIII.	3,05	1029,5	3,65	111,3	12,02	366,6	8,37	255,3	—
31. VIII./1. IX.	3,22	1029,7	3,15	101,4	11,47	369,3	8,32	267,9	—
1./2. IX.	3,02	1030,1	3,29	99,4	11,74	354,6	8,45	255,2	—
2./3. IX.	2,92	1030,0	3,40	99,3	11,84	345,7	8,44	246,4	317,0
Im Mittel . .	3,06	1029,6	3,37	103,1	11,71	358,2	8,34	255,1	326,0

Unter Berücksichtigung des Asche- und Proteingehaltes ergaben sich folgende Erträge an Milch und Milchbestandteilen im Mittel der Periode:

Milchmenge mg	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Asche %	Asche g	Organische Substanz %	Organische Substanz g	Fett %	Fett g	Protein (N · 6,25) %	Protein (N · 6,25) g	Milchzucker u. and. N-freie organ. Stoffe %	Milchzucker u. and. N-freie organ. Stoffe g
3,06	11,71	358,2	0,69	21,1	11,02	337,1	3,37	103,1	2,80	85,7	4,85	148,3

Es ist bemerkenswert, daß trotz eines sehr geringen Gehalts der Rationen an verdaulichem Stickstoff in der Grundfutterperiode I keine Verdauungsdepressionen der Nährstoffe beobachtet wurden, da weder durch Erdnußkuchen- noch durch Harnstoffzulage höhere Verdauungswerte erzielt werden konnten.

Einen Überblick über die Stickstoffbilanzen in den vorstehend mitgeteilten 4 Stoffwechselversuchen bringt die folgende Tabelle.

Tabelle LXIII.

Stickstoffbilanzen in den Stoffwechselversuchen an der Kuh Nr. 4

Periode I (Gewicht i. M. 306 kg).

Futterverzehr: 4,02 kg Wiesenheu, 8,85 kg eingesäuerte Zuckerrüben und 106 g Salze.

Im Futter N g	Im Harn N g	Im Harn N % der Zufuhr	Im Kot N g	Im Kot N % der Zufuhr	In 4,85 kg Milch N g	In 4,85 kg Milch N % der Zufuhr	N-Ausscheidung insgesamt %	N-Ausscheidung insgesamt % der Zufuhr	N Bilanz
70,45	19,58	27,8	46,51	66,0	20,02	28,4	86,11	122,2	−15,66

Periode II (Gewicht i. M. 313 kg).

Futterverzehr: 4,02 kg Wiesenheu, 8,85 kg eingesäuerte Zuckerrüben, 589,5 g Erdnußkuchen und 106 g Salze.

					In 4,82 kg Milch				
120,15	51,18	42,6	55,64	46,4	20,13	16,7	126,95	105,7	−6,80

Periode III (Gewicht i. M. 305 kg).

Futterverzehr: 3,94 kg Wiesenheu, 8,85 kg eingesäuerte Zuckerrüben, 601,5 g Kartoffelflocken, 104,7 g Harnstoff und 106 g Salze.

Im Futter N	Im Harn N		Im Kot N		In 3,76 kg Milch N		N-Ausscheidung insgesamt		N-Bilanz
g	g	% der Zufuhr	%	% der Zufuhr	g	% der Zufuhr	g	% der Zufuhr	
127,91	59,21	46,3	54,29	42,4	18,29	14,3	131,79	103,0	—3,88

Periode IVb (Gewicht i. M. 305 kg).

Futterverzehr: 3,87 kg Wiesenheu, 8,85 kg eingesäuerte Zuckerrüben, 112,5 g Harnstoff und 106 g Salze.

					In 3,06 kg Milch				
118,70	62,08	52,3	48,81	41,1	13,72	11,6	124,61	105,0	—5,91

In der Grundfutterperiode I verlor die Kuh infolge ungenügender Stickstoffzufuhr täglich im Mittel 15,66 g N von ihrem Körperbestande. Dieser Verlust sank auf 6,8 g N pro Tag in Periode II durch die proteinreichere Ernährung mit 0,59 kg Erdnußkuchen. In der Kartoffelflocken-Harnstoffperiode III war der Stickstoffverlust vom Körper mit 3,88 g N noch geringer, es fand hier schon eine Annäherung an das Stickstoffgleichgewicht statt. Auch während der Periode IVb bei Zulage von Harnstoff ohne Kartoffelflocken zum Grundfutter waren die N-Verluste mit 5,91 g noch etwas kleiner als in der Erdnußkuchenperiode II. Wir ersehen aus diesen Versuchen eindeutig, *daß in Übereinstimmung mit den Ergebnissen an Hammellämmern, die den Harnstoff für die Fleischbildung benutzten* (l. c.), *hier das Carbamid an Stelle des Nahrungseiweißes in einem gewissen Umfange für die Milch- bzw. Fleischbildung verwendet worden war*. Zwar war der Milchertrag in der Harnstoffperiode nur ungefähr derselbe wie in der Grundfutterperiode I. Ein Vergleich dieser mit der abschließenden Grundfutterperiode IVa erweist aber eine stark fallende Tendenz der Milchleistung. Die Harnstoff-Rübenzulage hat demnach den Abfall der Milchsekretion aufgehoben, es ist also eine gewisse Milchmenge aus Harnstoff und Zuckerrüben gebildet worden, die, wie wir weiter unten sehen werden, 0,82 kg Milch mit 121,7 g Milchtrockensubstanz betrug. Die weiteren Daten über die Mehrerträge an Milch und Milchbestandteilen in den Erdnußkuchen- bzw. Harnstoffperioden gegenüber den Grundfutterperioden sollen mit den entsprechenden Erträgen der Kühe Nr. 2 und 3 im Zusammenhang besprochen werden (siehe S. 421).

Es ist nun von Interesse festzustellen, inwieweit das in den Perioden I—IVb verfütterte verdauliche Reineiweiß zur Deckung des Bedarfes an N-haltigen Nährstoffen ausreichte, und in welchem Umfange das Futtereiweiß durch Harnstoff ersetzt werden konnte. Die folgende Übersicht gibt Aufschluß über den Gehalt der Rationen an verdaulichem

Reineiweiß, die gewonnenen Mengen an Milcheiweiß und die Eiweißverluste vom Körper.

Tabelle LXIII a.

	Reineiweiß im Futter g	Reineiweiß im Kot g	Verdaul. Reineiweiß g	Milcheiweiß g	Eiweißansatz g
Periode I: Grundfutter . .	360,4	176,4	184.0	125,1	−97.9
Periode II: Grundfutter u. Erdnußkuchen	633,9	261,3	372.6	125,8	−42.5
Periode III: Grundfutter und Harnstoff und Kartoffelflocken.	360,4	234,2	126.2	114,3	−24,2
Periode IVb: Grundfutter und Harnstoff	314,8	236,9	77,9	85,8	−36,9

Zunächst bedürfen die vorstehenden, direkt ermittelten Zahlen für den Gehalt der Rationen an verdaulichem Reineiweiß einer Korrektur. In der Harnstoff-Kartoffelflockenperiode III wurde im Grundfutter dieselbe Menge Reineiweiß verfüttert und wahrscheinlich auch verdaut wie in der Grundfutterperiode I. Das waren also *184 g* verdauliches Reineiweiß. Bei dem im Kot der Harnstoff-Kartoffelflockenperiode III im Vergleich zu der Grundfutterperiode I um 57,8 höheren Reineiweißgehalt handelt es sich um den unverdaulichen Anteil des aus dem verfütterten Harnstoff und Kohlenhydraten gebildeten Bakterieneiweißes, das also nicht in Rechnung gestellt werden darf. Analog ergibt sich für die Harnstoffperiode IVb eine aus dem Grundfutter wirklich resorbierte Menge von *160,7 g* Reineiweiß.

Außer den 184 g des im Grundfutter für die Periode III verabreichten Reineiweißes waren in der Zulage von 0,6 kg Kartoffelflocken noch 7,9 g an verdaulichem Reineiweiß enthalten, so daß die Gesamtmenge des letzteren 191,8 g betrüge. Der bisher beobachtete Minimalbedarf an verdaulichem Reineiweiß ist bei trockenstehenden Kühen nach den Kopenhagener Versuchen (l. c.) 200 g pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag. Demnach würde unsere Kuh Nr. 4 während der Bilanzversuche I—IVb folgende Mengen an verdaulichem Eiweiß für die Erhaltung benötigt haben:

Tabelle LXIII b.

	Mittleres Gewicht der Kuh Nr. 4 kg	Minimalbedarf an verdaulichem Eiweiß g
Periode I. Grundfutter.	306,0	61.2
„ II. Erdnußkuchen	312,5	62,5
„ III. Harnstoff u. Kartoffelflocken .	305,0	61,0
„ IVb. Harnstoff	326,0	65,2

In der Grundfutterperiode I standen demnach für die Milchbildung zur Verfügung 184 g verdauliches Eiweiß abzüglich des Erhaltungsbedarfes von 61,2 g; das wären also 122,8 g Reineiweiß. Die Milch

enthielt 125,1 g Eiweiß, so daß also, wenn wir von den Epidermoidalgebilden absehen, von dem Körperbestande der Kuh nur 2,3 g Eiweiß hätten verbraucht werden müssen. In Wirklichkeit verlor die Kuh aber 97,9 g Eiweiß von ihrem Körperbestande. Entweder reichten also die berechneten 61,2 g verdauliches Reineiweiß pro Kopf und Tag zur Deckung des Erhaltungsbedarfes nicht aus, weil der Stärkewert der Ration zu niedrig bemessen war (6,95 kg Stärkewert pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag), oder das über den Erhaltungsbedarf hinaus verfütterte Eiweiß konnte nicht zu 100% für die Milchbildung verwandt werden, oder es kommt drittens wahrscheinlich beides in Betracht.

In der Erdnußkuchenperiode II standen für die Milchbildung 372,6 g — 62,5 g = 310,1 g verdauliches Eiweiß zur Verfügung bei einem Stärkewert der Ration von 8,59 kg pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag. Die Milch enthielt 125,8 g Eiweiß. Das waren nur 40,6% des für die Produktion disponiblen verdaulichen Reineiweißes. Trotzdem reichte das verdauliche Futtereiweiß für den Bedarf nicht aus, da die Kuh 42,5 g Eiweiß von ihrem Körpergewicht verlor. Hieraus kann nun gefolgert werden, daß die berechneten 62,5 g verdauliches Eiweiß pro Kopf und Tag für die Deckung des Erhaltungsbedarfes nicht genügten. Es fehlten hier mindestens noch 42,5 g an verdaulichem Eiweiß, die die Kuh verlor, so daß der Minimalbedarf hieran bei den vorstehenden Versuchen mit 62,5 + 42,5 = 105 g pro Kopf und Tag bzw. mit 0,34 kg pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag zu veranschlagen ist. Dieser Wert stimmt mit dem in der Grundfutterperiode I an derselben Kuh ermittelten (0,33 kg) überein (siehe S. 380). Für die Milchbildung waren unter dieser Voraussetzung 372,6 + 42,5 — 105,0 = 310,1 g verdauliches Protein erforderlich. Da die Milch 125,8 g Protein im Durchschnitt enthielt, betrug die Verwertung des Produktionseiweißes somit 40,6%.

In der Harnstoff-Kartoffelflockenperiode III enthielt die Ration für die Milchbildung 191,9 — 61 = 130,9 g verdauliches Reineiweiß, in der Milch waren 114,3 g Eiweiß enthalten, so daß der Überschuß 16,6 g Reineiweiß betrug. Der Eiweißverlust vom Körper war hier nur 24,2 g gegenüber 42,5 g in der Erdnußkuchenperiode II, trotzdem während der letzteren 372,6 g verdauliches Reineiweiß pro Kopf und Tag verfüttert worden war gegenüber nur 191,9 g in der Harnstoff-Kartoffelflockenperiode III. Der Harnstoff war also an Stelle des Nahrungseiweißes in einem gewissen Umfange verwertet worden, den wir versuchen wollen rechnerisch zu bestimmen. Als Minimalbedarf an verdaulichem Eiweiß für die in der Erdnußkuchenperiode II und in der Harnstoff-Kartoffelflockenperiode III sezernierten Milchmengen setzen wir erstens die wirklich verfütterten Mengen an verdaulichem Protein und zweitens den Eiweißverlust vom Körper ein. Von den Summen ist der minimale Erhaltungsbedarf von 105,0 g in Abzug zu bringen.

Tabelle LXIII c.

	Periode II (Erdnußkuchen) g	Periode III (Harnstoff-Kartoffelflocken) g
Verdauliches Reineiweiß im Futter	372,6	191,9
Eiweißverlust vom Körper	42,5	24,2
Summe	415,1	216,1
Minimalbedarf für die Erhaltung	105,0	105,0
Es restieren für die Milchbildung	310,1	111,1
An Milchprotein wurden erhalten	125,8	114,3

Legen wir nun die Verwertung des Produktionseiweißes in der Erdnußkuchenperiode II von 40,6% zugrunde, so berechnet sich für die Harnstoffperiode III ein Bedarf von 281,8 g verdaulichem Eiweiß; die Ration enthielt aber nur 111,1 g an verdaulichem Eiweiß für die Milchproduktion, demnach wurden durch die verfütterten 104,7 g Harnstoff 281,8 — 111,1 = 170,7 g verdauliches Futtereiweiß ersetzt bzw. durch 1 kg Harnstoff 1,63 kg.

In der Harnstoffperiode IVb enthielt die Ration 160,7 g verdauliches Reineiweiß, der Eiweißverlust vom Körper betrug 36,9 g, d. s. zusammen 197,6 g. Hiervon ist zu subtrahieren der Erhaltungsbedarf von 105,0 g. Es restieren für die Milchbildung 92,6 g verdauliches Eiweiß, in der Milch wurden gefunden 85,8 g Protein. Die tägliche Harnstoffgabe betrug in der Periode IVb 112,5 g. Hieraus berechnet sich in analoger Weise wie für die Harnstoff-Kartoffelflockenperiode III, daß durch 1 kg Harnstoff 1,06 kg verdauliches Produktionseiweiß für die Milchbildung ersetzt wurde. Die Verwertung des Harnstoffs wäre hiernach eine schlechtere als in der Periode III, was im Hinblick auf die immer geringer werdenden Milchmengen infolge der vorgeschrittenen Lactation nicht anders zu erwarten war. Aus diesem Grunde sind auch die Verwertungszahlen für den Harnstoff schon in der Harnstoff-Kartoffelflockenperiode III relativ niedrig.

Versuche an den Kühen Nr. 2 und 3.

Über die Reihenfolge der Perioden ist einleitend zu der Versuchsreihe D bereits das Erforderliche gesagt worden.

Zu Beginn befand sich die Kuh Nr. 2 im 2. und die Kuh Nr. 3 im 5. Monat der Lactation. Kuh 2 war eine schlechte Milchkuh. Sie gab auch kurz nach dem Kalben trotz proteinreicher Ernährung (Biertreber und Malzkeime) nur wenig Milch (ca. 7 Liter). Ihr Ernährungszustand ließ nichts zu wünschen übrig.

Die folgenden Tabellen LXIV—LXXXIII enthalten die Daten über den Futterverzehr, die Nährstoffzufuhr und über die Milcherträge.

Versuchsreihe D. Grundfutterperiode I (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben + Salze). Vom 11./12. IV. bis 24./25. IV. 1921,

Tabelle LXIV.

Futterverzehr der Kuh Nr. 2 (mittleres Gewicht 473,0 kg) im Mittel pro Tag.

Ration	Trocken-substanz kg	Asche kg	Organische Substanz kg	Roh-protein kg	Rein-eiweiß kg	Amide kg	Rohfett kg	Rohfaser kg	N-freie Extrakt-stoffe kg
6,80 kg Wiesenheu	5,8300	0,4130	5,4170	0,5084	0,4629	0,0455	0,1140	1,7720	3,0226
15,0 kg eingesäuerte Zuckerrüben .	3,1680	0,2370	2,9310	0,2190	0,1365	0,0825	0,0165	0,2100	2,4855
Summe Rohnährstoffe	8,9980	0,6500	8,3480	0,7274	0,5994	0,1280	0,1305	1,9820	5,5081

Hierzu 135 g Salze.

Verdauliche Nährstoffe.

In der Ration	Organische Substanz		Rohprotein		Rohfett		Rohfaser		N-freie Extraktstoffe		Stärke-wert
	%	kg	%	kg	%	kg	%	kg	%	kg	kg
Verdauliche Nährstoffe	63,4	5,30	28,9	0,21	−7,8	−0,01	60,4	1,20	70,3	3,91	3,61
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	—	—	—	**0,44**	—	—	—	—	—	—	**7,63**

Milchertrag pro Kopf und Tag . . . . 6,32 kg
" " 500 kg Lebendgewicht und Tag . . . 6,68 kg

Tabelle LXV.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 2 in der Grundfutterperiode I. (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben + Salze).

Tag 1921	Milchmenge kg	Spezifisches Gewicht	Fett %	Fett g	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Fettfreie Trockensubstanz %	Fettfreie Trockensubstanz g	Gewicht der Kuh kg	Stalltemperatur °C Max.	Stalltemperatur °C Min.	Stalltemperatur °C Mittel
11./12. IV.	7,03	—	—	—	—	—	—	—	483	20,0	17,0	18,5
12./13. IV.	6,79	—	—	—	—	—	—	—	—	20,0	17,0	18,5
13./14. IV.	6,92	—	—	—	—	—	—	—	470	21,0	17,0	19,0
14./15. IV.	6,93	—	—	—	—	—	—	—	—	18,0	14,0	16,0
15./16. IV.	6,73	1030,6	2,89	194,5	11,38	765,9	8,49	571,4	470	16,5	12,5	14,5
16./17. IV.	6,26	—	—	—	—	—	—	—	—	16,0	13,0	14,5
17./18. IV.	6,29	—	—	—	—	—	—	—	—	16,0	13,0	14,5
18./19. IV.	6,60	1030,9	2,84	187,4	11,40	752,4	8,56	565,0	465	16,0	12,0	14,0
19./20. IV.	6,48	—	—	—	—	—	—	—	—	16,5	12,5	14,5
20./21. IV.	6,10	—	—	—	—	—	—	—	—	16,5	13,5	15,0
Mittel der 6 Tage 15./16. bis 20./21. IV.	6,41*)	1030,7	2,87	184,0	11,39	730,1	8,52	546,1	—	—	—	—
21./22. IV.	6,27	1031,0	2,93	183,7	11,53	722,9	8,60	539,2	470	17,0	13,0	15,0
22./23. IV.	6,39	1030,8	2,87	183,4	11,41	729,1	8,54	545,7	—	17,0	14,0	15,5
23./24. IV.	6,07	1030,5	3,00	182,1	11,49	697,5	8,49	515,4	—	17,5	15,5	16,5
24./25. IV.	6,00	1031,0	2,67	178,2	11,58	694,8	8,61	516,6	480	18,0	16,0	17,0
Im Mittel der letzten 10 Tage	6,32	1030,8	2,90	183,1	11,43	722,5	8,53	539,4	Im Mittel der ganzen Periode 473,0	—	—	—

*) Ursprünglich wurde auch noch die Kuh Nr. 1 in den Versuch eingestellt; sie erhielt dieselbe Ration wie die Kuh Nr. 2. Am 5. und 8. Versuchstage wurde die Milch beider Kühe gesondert analysiert, an den übrigen Tagen nur die Mischmilch. Da der Versuch an der Kuh Nr. 1 infolge geringer Freßlust nicht fortgesetzt werden konnte, haben wir für die Berechnung der durchschnittlichen Zusammensetzung der von der Kuh Nr. 2 sezernierten Milch an den 6 Versuchstagen 15./16. bis 20./21. IV. 1921 die Mittelwerte aus den Analysen des 5. und 8. Versuchstages zugrunde gelegt. Die Mittelzahlen für die Erträge an Milch und Einzelbestandteilen derselben weisen übrigens bei dem sechstägigen gegenüber dem zehntägigen Durchschnitt nur ganz unwesentliche Abweichungen auf.

Versuchsreihe D. **Hauptperiode II (Grundfutter + Erdnußkuchen). Vom 25./26. IV. bis 6./7. V. 1921.**

Tabelle LXVI.

Futterverzehr der Kuh Nr. 2 (mittleres Gewicht 456,4 kg) im Mittel pro Tag.

Ration	Trockensubstanz kg	Asche kg	Organ. Substanz kg	Rohprotein kg	Reineiweiß kg	Amide kg	Rohfett kg	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe kg
.80 kg Wiesenheu	5,8300	0,4130	5,4170	0,5084	0,4629	0,0455	0,1140	1,7720	3,0226
5.0 kg eingesäuerte Zuckerrüben	3,2430	0,2310	3,0120	0,2385	0,1485	0,0900	0,0165	0,2160	2,5410
.0 kg Erdnußkuchen	0,9043	0,0610	0,8433	0,5103	0,4625	0,0478	0,0590	0,0378	0,2362
umme Rohnährstoff.	9,9773	0,7050	9,2723	1,2572	1,0739	0,1833	0,1895	2,0258	5,7998

Hierzu 135 g Salze.

Verdauliche Nährstoffe.

In der Ration	Organische Substanz %	Organische Substanz kg	Rohprotein %	Rohprotein kg	Rohfett %	Rohfett kg	Rohfaser %	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe %	N-freie Extraktstoffe kg	Stärkewert kg
'erdaul. Nährstoffe Summe	63,4	5,88	50,9	0,64	4,7	0,01	60,8	1,23	68,8	4,01	4,22
'ro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	—	—	—	**1,40**	—	—	—	—	—	—	**9,25**

Milchertrag pro Kopf und Tag . . . . 7,35 kg

„ „ 500 kg Lebendgewicht und Tag . . . . . 8,05 kg

Tabelle LXVII.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 2 in der Hauptperiode II (Grundfutter + Erdnußkuchen).

Tag 1921	Milchmenge kg	Spezifisches Gewicht	Fett %	Fett g	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Fettfreie Trockensubstanz %	Fettfreie Trockensubstanz g	Gewicht der Kuh kg	Stalltemperatur °C Max.	Min.	Mittel
25./26. IV.	6,04	1030,8	2,90	175,2	11,44	691,0	8,54	515,8	480	18,5	16,5	17,5
26. 27. IV.	6,42	1031,2	3,08	197,7	11,76	755,0	8,68	557,3	465	20,0	17,0	18,5
27. 28. IV.	6,30	1031,2	3,17	199,7	11,87	747,8	8,70	548,1	—	21,0	17,0	19,0
28./29. IV.	7,07	1030,3	3,15	222,7	11,62	821,5	8,47	598,8	470	20,0	17,0	18,5
29. 30. IV.	7,18	1030,6	3,18	228,3	11,73	842,2	8,55	613,9	—	20,0	16,0	18,0
30./1. V.	7,29	1030,7	3.28	239,1	11,87	865,3	8,59	626,2	—	20,0	16,0	18,0
1. 2. V.	7,40	1030.6	3,17	234,6	11,72	867,3	8,55	632,7	453	20,0	16,0	18,0
2. 3. V.	7,39	1030,4	3,21	237,2	11,72	866,1	8,51	628,9	—	20,0	16,0	18,0
3./4. V.	7,55	1031,0	3,30	249,1	11,97	903,7	8,67	654,6	440	19,0	15,0	17,0
4. 5. V.	7,73	1030,7	3,97	229,6	11,50	889,0	8,53	659,4	—	18,0	15.0	16,5
5./6. V.	7,74	1030,9	3,06	236,8	11,66	902,5	8,60	665,7	447	17,0	13,0	15.0
6./7. V.	6,84	1030,8	3,15	215,5	11,74	803,0	8,59	587,5	440	18,0	14,0	16,0
n Mittel er letzten Tage . .	7,35	1030.7	3,16	232,5	11.73	862.3	8.57	629,8	Im Mittel der ganzen Periode 456,4	—	—	—

Versuchsreihe D. Hauptperiode III (Grundfutter + Kartoffelflocken + Harnstoff). Vom 7./8. bis 27./28. Mai 1921.

Tabelle LXVIII.

Futterverzehr der Kuh Nr. 2 (mittleres Gewicht 456,3 kg) im Mittel pro Tag.

Ration	Trockensubstanz	Asche	Organische Substanz	Rohprotein	Reineiweiß	Amide	Rohfett	Rohfaser	N-freie Extraktstoffe
	kg	kg	kg	kg	kg	kg	kg	kg	kg
6,76 kg Wiesenheu . . .	5,8300	0,4130	5,4170	0,5084	0,4629	0,0455	0,1140	1,7720	3,0226
15,0 kg eingesäuerte Zuckerrüben	3,0000	0,2610	2,7390	0,2550	0,1500	0,1050	0,0165	0,1905	2,2770
1,02 kg Kartoffelflocken abzüglich 0,3402 kg N-freie Extraktstoffe	0,5476	0,0299	0,5177	0,0636	0,0406	0,0230	0,0023	0,0078	0,4440
0,1776 kg Harnstoff + 0,3402 kg N-freie Extraktstoffe aus den Kartoffelflocken	0,1776 0,3402	0,0001 —	0,1775 0,3402	0,5177	—	0,5177	—	—	—
Rohnährstoffe Summe . .	9,8954	0,7040	9,1914	1,3447	0,6535	0,6912	0,1328	1,9703	5,7436

Hierzu 135 g Salze.

Verdauliche Nährstoffe.

In der Ration	Organische Substanz		Rohprotein		Rohfett		Rohfaser		N-freie Extraktstoffe		Stärkewert
	%	kg	%	kg	%	kg	%	kg	%	kg	kg
Verdauliche Nährstoffe Summe . . .	65,8	6,05	54,3	0,73	−10,0	−0,01	59,1	1,17	72,0	4,17	4,37
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	—	—	—	**1,60**	—	—	—	—	—	—	**9,58**

Milchertrag pro Kopf und Tag . . . . 6,98 kg

" " 500 kg Lebendgewicht und Tag . . . . 7,65 kg

Tabelle LXIX.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 2 in der Hauptperiode III (Grundfutter + Kartoffelflocken + Harnstoff.)

Tag 1921	Milchmenge kg	Spezifisches Gewicht	Fett %	Fett g	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Fettf.Trock.-Subst. %	Fettf.Trock.-Subst. g	Gewicht der Kuh kg	Stalltemperatur °C Max.	Stalltemperatur °C Min.	Stalltemperatur °C Mittel
7./8. V.	7,90	1030,2	3,02	238,6	11,44	903,8	8,42	665,2	440	19,0	16,0	17,5
8./9. V.	7,83	1031,4	3,12	244,3	11,86	928,6	8,74	684,3	450	22,0	19,0	20,5
9./10. V.	7,65	1031,2	3,17	242,5	11,87	908,0	8,70	665,5	—	23,0	18,0	20,5
10./11. V.	7,40	1031,3	3,38	250,1	12,14	898,3	8,76	648,2	450	22,0	17,0	19,5
11./12. V.	7,04	1030,7	3,47	244,3	12,10	851,8	8,63	607,5	—	22,0	18,0	20,0
12./13. V.	6,67	1031,0	3,52	234,8	12,24	816,4	8,72	581,6	460	21,0	19,0	20,0
13./14. V.	6,51	1030,4	3,47	225,9	12,03	783,2	8,56	557,3	475	—	—	—
14./15. V.	6,54	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15./16. V.	6,58	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16./17. V.	6,55	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17./18. V.	6,48	1030,5	3,16	204,8	11,68	756,9	8,52	552,1	464	25,0	21,0	23,0
18./19. V.	6,80	1030,3	3,00	204,0	11,44	777,9	8,44	573,9	—	24,0	21,0	22,5
19./20. V.	6,84	1030,4	2,90	198,4	11,34	775,7	8,44	577,3	—	24,0	20,0	22,0
20./21. V.	6,78	1030,5	2,97	201,4	11,45	776,3	8,48	574,9	456	19,5	18,5	19,0
21./22. V.	6,69	1030,8	3,07	205,4	11,65	779,4	8,58	574,0	—	21,0	20,0	20,5
22./23. V.	7,27	1031,0	2,88	209,4	11,47	833,9	8,59	624,5	459	22,0	20,0	21,0
23./24. V.	7,03	1030,6	3,03	213,0	11,55	812,0	8,52	599,0	—	22,0	21,0	21,5
24./25. V.	7,05	1031,2	3,07	216,4	11,75	828,4	8,68	612,0	—	23,0	21,0	22,0
25./26. V.	7,24	1031,5	3,10	224,4	11,86	858,6	8,76	634,2	—	24,0	21,0	22,5
26./27. V.	7,07	1031,6	3,28	231,9	12,10	855,5	8,82	623,6	—	26,0	21,0	23,5
27./28. V.	7,55	1031,0	3,20	241,6	11,85	894,7	8,65	653,1	453	26,0	22,0	24,0
Mittel d. letzten 11 Tage: . .	6,98	1030,9	3,06	213,7	11,66	813,6	8,60	599,9	Im Mittel der ganzen Periode: 456,3	—	—	—

Versuchsreihe D. Hauptperiode IV (Grundfutter + Kartoffelflocken.) Vom 28./29. Mai bis 8./9. Juni 1921.

Tabelle LXX.

Futterverzehr der Kuh Nr. 2 (Mittleres Gewicht 467,2 kg) im Mittel pro Tag.

Ration	Trockensubstanz	Asche	Organische Substanz	Rohprotein	Reineiweiß	Amide	Rohfett	Rohfaser	N-freie Extraktstoffe
	kg	kg	kg	kg	kg	kg	kg	kg	kg
6,69 kg Wiesenheu . . .	5.8300	0,4130	5,4170	0,5084	0,4629	0.0455	0,1140	1,7720	3,0226
15,0 kg eingesäuerte Zuckerrüben	3,3420	0,2430	3,0990	0,2580	0.1515	0,1065	0,0165	0,2160	2,6085
1,02 kg Kartoffelflocken .	0,8878	0,0299	0,8579	0,0636	0,0406	0,0230	0,0023	0,0078	0,7842
Rohnährstoffe Sa.	10,0598	0,6859	9,3739	0,8300	0,6550	0,1750	0,1328	1,9958	6,4153

Hierzu 135 g Salze.

Verdauliche Nährstoffe.

In der Ration	Organische Substanz		Rohprotein		Rohfett		Rohfaser		N-freie Extraktstoffe		Stärkewert
	%	kg	%	kg	%	kg	%	kg	%	kg	kg
Heu + eingesäuerte Zuckerrüben . .	63,4	5,40	29,3	0,22	−7,8	−0,01	60,4	1,20	70,3	4,00	3,71
Kartoffelflocken	85	0,73	42	0,03	—	—	—	—	89	0,70	0,73
Verdauliche Nährstoffe Summe . . .	—	6,13	30,1	0,25	–	−0,01	—	1,20	—	4,70	**4,44**
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	—	—	—	**0,54**	—	—	—	—	—	—	**9,50**

Milchertrag pro Kopf und Tag . . . . 6,07 kg
" " 500 kg Lebendgewicht und Tag . . . . 6,50 "

Tabelle LXXI.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 2 in der Hauptperiode IV (Grundfutter und Kartoffelflocken).

Tag	Milchmenge	Spezifisches Gewicht	Fett		Trockensubstanz		Fettfreie Trockensubstanz		Gewicht der Kuh	Stalltemperatur °C		
1921	kg		%	g	%	g	%	g	kg	Max.	Min.	Mittel
28./29. V.	6,77	1031,2	3,50	237,0	12,26	830,0	8,76	593,0	453	23,0	21,0	22,0
29./30. V.	7,07	1030,8	3,32	234,7	11,95	844,9	8,63	610,2	—	22,0	19,0	20,5
30./31. V.	6,48	1031,2	3,50	226,8	12,26	794,5	8,76	567,7	—	23,0	19,0	21,0
31. V./1. VI.	6,49	1031,2	3,17	205,7	11,87	770,3	8,70	564,6	463	25,0	21,0	23,0
1./2. VI.	6,41	1031,2	3,03	194,2	11,70	750,0	8,67	555,8	—	25,0	21,0	23,0
2./3. VI.	6,20	1031,3	3,11	192,8	11,82	732,8	8,71	540,0	—	27,0	23,0	25,0
3./4. VI.	6,20	1031,3	3,00	186,0	11,69	724,8	8,69	538,8	467	29,0	26,0	27,5
4./5. VI.	6,39	1031,9	2,81	179,6	11,61	741,9	8,80	562,3	—	31,0	27,0	29,0
5./6. VI.	6,34	1030,5	3,38	214,3	11,94	757,0	8,56	542,7	480	30,0	20,0	25,0
6./7. VI.	5,48	1030,9	3,50	191,8	12,19	668,0	8,69	476,2	—	24,0	19,0	21,5
7./8. VI.	5,95	1030,8	3,05	181,5	11,62	691,4	8,57	509,9	470	24,0	21,0	22,5
8./9. VI.	5,56	1031,4	2,94	163,5	11,64	647,2	8,70	483,7	470	25,0	21,0	23,0
Im Mittel der letzten 8 Tage .	6,07	1031,1	3,10	188,0	11,76	714,1	8,66	526,1	Im Mittel der ganzen Periode 467,2	—	—	—

Versuchsreihe D. Grundfutterperiode V (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben + Salze). Vom 9./10. bis 24./25. Juni 1921.

Tabelle LXXII.

Futterverzehr der Kuh Nr. 2 (Mittleres Gewicht 454,4 kg) im Mittel pro Tag.

Ration	Trockensubstanz kg	Asche kg	Organ. Substanz kg	Rohprotein kg	Reineiweiß kg	Amide kg	Rohfett kg	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe kg
6,66 kg Wiesenheu . . .	5,8300	0,4130	5.4170	0,5084	0,4629	0,0455	0,1140	1.7720	3.0[illegible]
15,0 kg einges. Zuckerrüben	3,2895	0,3765	2,9130	0,2655	0,1080	0,1575	0,0135	0,2535	2.3[illegible]
Rohnährstoffe Summe . .	9,1195	0.7895	8,3300	0,7739	0.5709	0,2030	0,1275	2,0255	5.4[illegible]

Hierzu 135 g Salze.

Verdauliche Nährstoffe.

In der Ration	Organische Substanz %	Organische Substanz kg	Rohprotein %	Rohprotein kg	Rohfett %	Rohfett kg	Rohfaser %	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe %	N-freie Extraktstoffe kg	Stärkewert kg
Verdaul. Nährstoffe Summe	63.4	5,28	27,1	0,21	−7,8	−0,01	60,4	1,22	70,3	3,86	3,54
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	—	—	—	**0,46**	—	—	—	—	—	—	7,79

Milchertrag pro Kopf und Tag . . . . 6,01 kg
" " 500 kg Lebendgewicht und Tag . . . . . 6.61 kg

Tabelle LXXIII.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 2 in der Grundfutterperiode V (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben + Salze).

Tag 1921	Milchmenge kg	Spezifisches Gewicht	Fett %	Fett g	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Fettfreie Trockensubst. %	Fettfreie Trockensubst. g	Gewicht der Kuh kg	Stalltemperatur Max.	Stalltemperatur Min.	Stalltemperatur Mittel
9./10. VI.	5,87	1031,4	3,00	176,1	11,71	687,4	8,71	511,3	470	23,0	19,0	21,0
10./11. VI.	6,00	1032,0	3,00	180,0	11,86	711,6	8,86	531,6	460	23,0	18,0	20,5
11./12. VI.	5,88	1030,7	3,10	182,3	11,66	685.6	8,56	503,3	—	21,0	19,0	20,0
12./13. VI.	5,84	1031,1	3,15	184,0	11,82	690,3	8,67	506,3	460	19,0	17,0	18,0
13./14. VI.	6.44	1030.9	3,12	200.9	11,73	755,4	8,61	554,5	—	19,0	16,0	17,5
14./15. VI.	6.40	1030,7	3,13	200,3	11,69	748,1	8,56	547,8	451	19,0	16.0	17,5
15./16. VI.	6,30	1030,7	3,07	193,4	11,62	732,1	8,55	538,7	—	21,0	16,0	18,5
16./17. VI.	6,25	1030.8	3.07	191,9	11.65	728,1	8.58	536,2	—	21,0	16,0	18,5
17./18. VI.	6,11	1030,6	3,15	192,5	11,69	714,3	8.54	521,8	453	22.0	16.0	19,0
18./19. VI.	6,45	1031,1	2.83	182,5	11,43	737,2	8,60	554,7	—	20,0	16.0	18,0
19./20. VI.	6,10	1031,2	3,35	204,4	12,08	736,9	8,73	532,5	446	18.0	16.0	17,0
20./21. VI.	6,13	1031,0	3.25	199,2	11,91	730,1	8,66	530,9	—	18,0	16,0	17,0
21./22. VI.	5.75	1030.8	3.28	188,6	11,90	684,3	8,62	495,7	450	18,0	15,0	16,5
22./23. VI.	5,41	1030.9	3,26	176,4	11,90	643,8	8,64	467,4	450	19,0	15.0	17,0
23./24. VI.	5,55	1030,6	2,98	165,4	11,49	637,7	8,51	472,3	450	19,0	16,0	17,5
24./25. VI.	5,20	1030.9	3,25	169,0	11,89	618,3	8,64	449,3	—	20,0	15.0	17,5
Im Mittel der letzten 12 Tage .	6.01	1030,8	3,14	188,7	11,74	705,5	8.60	516.8	Im Mittel der ganzen Periode 454,4	—	—	—

Versuchsreihe D. **Grundfutterperiode I** (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben + Salze). Vom 11./12. April bis 24./25. April 1921.

Tabelle LXXIV.

Futterverzehr der Kuh Nr. 3 (mittleres Gewicht 378,2 kg) im Mittel pro Tag.

Ration	Trocken-substanz	Asche	Organische Substanz	Rohprotein	Reineiweiß	Amide	Rohfett	Rohfaser	N-freie Extraktstoffe
	kg	kg	kg	kg	kg	kg	kg	kg	kg
5,35 kg Wiesenheu	4,5810	0,3248	4,2562	0,3995	0,3637	0,0358	0,0898	1,3926	2,3743
11,8 kg eingesäuerte Zuckerrüben	2,4921	0,1864	2,3057	0,1723	0,1074	0,0649	0,0130	0,1652	1,9552
Rohnährstoffe Summe . . .	7,0731	0,5112	6,5619	0,5718	0,4711	0,1007	0,1028	1,5578	4,3295

Hierzu 106 g Salze.

Verdauliche Nährstoffe.

In der Ration	Organische Substanz		Rohprotein		Rohfett		Rohfaser		N-freie Extraktstoffe		Stärkewert
	%	kg	%	kg	%	kg	%	kg	%	kg	kg
Verdaul. Nährstoffe Summe	63,4	4,16	28,0	0,16	−7,8	−0,01	60,4	0,94	70,3	3,07	2,75
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	—	—	—	**0,42**	—	—	—	—	—	—	**7,27**

Milchertrag pro Kopf und Tag . . . . 7,85 kg
„ „ 500 kg Lebendgewicht und Tag . . . . 10,38 kg

Tabelle LXXV.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der **Kuh Nr. 3** in der Grundfutterperiode I (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben + Salze).

Tag	Milchmenge			Spezifisches Gewicht	Fett		Trockensubstanz		Fettfreie Trockensubstanz		Gewicht		Stalltemperatur C		
1921	Kuh 3 kg	Kuh 4*) kg	Summe kg		%	g	%	g	%	g	Kuh 3 kg	Kuh 4 kg	Max.	Min.	Mittel
11./12. IV.	8,18	6,27	14,45	1030,5	2,70	390,1	11,13	1608,3	8,43	1218,2	377	340	20,0	17,0	18,5
12./13. IV.	8,97	6,24	15,21	1029,9	2,55	387,9	10,80	1642,7	8,25	1254,8	—	—	20,0	17,0	18,5
13./14. IV.	9,50	6,15	15,65	1030,0	3,07	480,5	11,45	1792,0	8,38	1311,5	380	340	21,0	17,0	19,0
14./15. IV.	8,72	5,65	14,37	1030,0	2,90	416,7	11,24	1615,2	8,34	1198,5	—	—	18,0	14,0	16,0
15./16. IV.	8,19	5,15	13,34	1030,7	2,93	390,9	11,45	1527,5	8,52	1136,6	370		16,5	12,5	14,5
16./17. IV.	7,28	—	—	1031,3	2,77	201,7	11,41	830,7	8,64	629,0	—	—	16,0	13,0	14,5
17./18. IV.	7,45	—	—	1030,3	2,10	156,4	10,36	771,8	8,26	615,4	—		16,0	13,0	14,5
18./19. IV.	7,77	—	—	1031,5	2,37	184,1	10,98	853,1	8,61	669,0	373		16,0	12,0	14,0
19./20. IV.	8,75	—	—	1030,9	2,32	203,0	10,77	942,4	8,45	739,4	—	—	16,5	12,5	14,5
20./21. IV.	8,18	—	—	1030,4	2,27	185,7	10,59	866,3	8,32	680,6	—		16,5	13,5	15,0
21./22. IV.	7,22	—	—	1030,8	2,15	155,2	10,54	761,0	8,39	605,8	379	—	17,0	13,0	15,0
22./23. IV.	8,31	—	—	1030,1	2,40	199,4	10,67	886,6	8,27	687,2	—	—	17,0	14,0	15,5
23./24. IV.	7,49	—	—	1029,9	2,25	168,5	10,44	781,9	8,19	613,4	—	—	17,5	15,5	16,5
24./25. IV.	8,18	—	—	1030,2	2,45	200,4	10,75	879,3	8,30	678,9	390	—	18,0	16,0	17,0
Im Mittel der letzten 9 Tage .	**7,85**	—	—	**1030,6**	**2,34**	**183,8**	**10,72**	**841,4**	**8,38**	**657,6**	**Im Mittel der ganzen Periode 378,2**		—	—	—

*) Der Versuch an der Kuh Nr. 4 mußte am 16. IV. abgebrochen werden, weil sie die Rationen an den letzten Tagen nicht restlos verzehrt hatte.

Versuchsreihe D. Hauptperiode II (Grundfutter + Erdnußkuchen).
Vom 25./26. April bis 6./7. Mai 1921.

Tabelle LXXVI.
Futterverzehr der Kuh Nr. 3 (mittleres Gewicht 365,3 kg) im Mittel pro Tag.

Ration	Trockensubstanz kg	Asche kg	Organ. Substanz kg	Rohprotein kg	Reineiweiß kg	Amide kg	Rohfett kg	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe kg
,35 kg Wiesenheu . . .	4,5810	0,3248	4,2562	0,3995	0,3637	0,0358	0,0898	1,3926	2,3743
1,8 kg einges. Zuckerrüben	2,5512	0,1817	2,3695	0,1876	0,1168	0,0708	0,0130	0,1699	1,9990
,786 kg Erdnußkuchen .	0,7108	0,0480	0,6628	0,4011	0,3635	0,0376	0,0463	0,0297	0,1857
Rohnährstoffe Summe . .	7,8430	0,5545	7,2885	0,9882	0,8440	0,1442	0,1491	1,5922	4,5590

Hierzu 106 g Salze.

Verdauliche Nährstoffe.

In der Ration	Organische Substanz %	Organische Substanz kg	Rohprotein %	Rohprotein kg	Rohfett %	Rohfett kg	Rohfaser %	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe %	N-freie Extraktstoffe kg	Stärkewert kg
Verdaul. Nährstoffe Summe	63,4	4,62	50,6	0,50	4,7	0,01	60,8	0,97	68,8	3,15	**3,31**
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	—	—	—	**1,87**	—	—	—	—	—	—	**9,06**

Milchertrag pro Kopf und Tag . . . . 9,13 kg
„ „ 500 kg Lebendgewicht und Tag . . . . 12,50 kg

Tabelle LXXVII.
Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 3 in der Hauptperiode II (Grundfutter + Erdnußkuchen).

Tag 1921	Milchmenge kg	Spezifisches Gewicht	Fett %	Fett g	Trockensubstanz %	Trockensubstanz g	Fettfreie Trockensubst. %	Fettfreie Trockensubst. g	Gewicht der Kuh kg	Stalltemperatur °C Max.	Min.	Mitt.
25./26. IV.	7,25	1030,2	2,05	148,6	10,27	744,6	8,22	596,0	390	18,5	16,5	17,5
26./27. IV.	9,25	1030,4	2,50	231,2	10,86	1004,5	8,36	773,3	370	20,0	17,0	18,5
27./28. IV.	8,68	1030,3	1,95	169,3	10,18	883,6	8,23	714,3	—	21,0	17,0	19,0
28./29. IV.	9,62	1029,8	2,50	240,5	10,71	1030,3	8,21	789,8	370	20,0	17,0	18,5
29./30. IV.	8,40	1030,1	2,45	205,8	10,73	901,3	8,28	695,5	—	20,0	16,0	18,0
30.IV./1.V.	10,53	1029,3	3,02	318,0	11,21	1180,4	8,19	862,4	—	20,0	16,0	18,0
1./2. V.	8,73	1030,3	2,20	192,1	10,48	914,9	8,28	722,8	355	20,0	16,0	18,0
2./3. V.	8,70	1029,9	2,82	245,3	11,12	967,4	8,30	722,1	—	20,0	16,0	18,0
3./4. V.	9,73	1029,8	2,82	274,4	11,10	1080,0	8,28	805,6	355	19,0	15,0	17,0
4./5. V.	6,03	1030,4	2,07	124,8	10,35	624,1	8,28	499,3	—	18,0	15,0	16,5
5./6. V.	11,44	1029,5	2,79	319,2	10,98	1256,1	8,19	936,9	360	17,0	13,0	15,0
6./7. V.	9,02	1030,2	2,34	211,1	10,62	957,9	8,28	746,8	357	18,0	14,0	16,0
Im Mittel der letzten 9 Tage:	9,13	1029,9	2,59	236,8	10,85	990,3	8,26	753,5	Im Mittel der ganzen Periode 365,3	—	—	—

Versuchsreihe D. Hauptperiode III (Grundfutter + Harnstoff + Kartoffelflocken). Vom 7./8. Mai bis 27./28. Mai 1921.

Tabelle LXXVIII.

Futterverzehr der Kuh Nr. 3 (mittleres Gewicht 363,5 kg) im Mittel pro Tag.

Ration	Trockensubstanz kg	Asche kg	Organische Substanz kg	Rohprotein kg	Reineiweiß kg	Amide kg	Rohfett kg	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe kg
5,31 kg Wiesenheu	4,5810	0,3248	4,2562	0,3995	0,3637	0,0358	0,0898	1,3926	2,3743
11,8 kg eingesäuerte Zuckerrüben	2,3600	0,2053	2,1547	0,2006	0,1180	0,0826	0,0130	0,1499	1,7912
0,802 kg Kartoffelflocken abzügl. 0,267 kg N-freier Extraktstoffe	0,4307	0,0235	0,4072	0,0500	0,0319	0,0181	0,0018	0,0061	0,3493
0,1396 kg Harnstoff + 0,2673 kg N-freie Extraktstoffe aus den Kartoffelflocken	0,1395 0,2673	0,0001 —	0,1394 0,2673	0,4067	—	**0,4067**	—	—	—
Rohnährstoffe Summe	7,7785	0,5537	7,2248	1,0568	0,5136	0,5432	0,1046	1,5486	4,5148

Hierzu **106** g Salze.

Verdauliche Nährstoffe.

In der Ration	Organische Substanz %	Organische Substanz kg	Rohprotein %	Rohprotein kg	Rohfett %	Rohfett kg	Rohfaser %	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe %	N-freie Extraktstoffe kg	Stärkewert kg
Verdauliche Nährstoffe Summe	65,8	4,75	55,0	0,58	−10,0	−0,01	59,1	0,91	72,0	3,28	3,43
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	—	—	—	**1,60**	—	—	—	—	—	—	**9,44**

Milchertrag pro Kopf und Tag . . . . 7,48 kg
„ „ 500 kg Lebendgewicht und Tag . . . . 10,29 kg

Tabelle LXXIX.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 3 in der Hauptperiode III (Grundfutter + Kartoffelflocken + Harnstoff).

Tag	Milchmenge	Spezifisches Gewicht	Fett		Trockensubstanz		Fettfreie Trockensubstanz		Gewicht der Kuh	Stalltemperatur ° C		
1921	kg		%	g	%	g	%	g	kg	Max.	Min.	Mittel
7./8. V.	9,03	1030,7	2,50	225,8	10,94	987,9	8,44	762,1	357	19,0	16,0	17,5
8./9. V.	8,55	1030,5	2,21	189,0	10,54	901,2	8,33	712,2	360	22,0	19,0	20,5
9./10. V.	8,47	1030,5	2,56	216,8	10,96	928,3	8,40	711,5	—	23,0	18,0	20,5
10./11. V.	8,48	1030,4	2,54	215,4	10,91	925,2	8,37	709,8	360	22,0	17,0	19,5
11./12. V.	8,35	1030,2	2,40	200,4	10,69	892,6	8,29	692,2	—	22,0	18,0	20,0
12./13. V.	8,30	1031,0	2,67	221,6	11,22	931,3	8,55	709,7	356	21,0	19,0	20,0
13./14. V.	6,57	1030,6	2,10	138,0	10,43	685,3	8,33	547,3	380	—	—	—
14./15. V.	8,41	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15./16. V.	8,79	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16./17. V.	6,63	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17./18. V.	7,83	1029,8	2,44	191,1	10,64	833,1	8,20	642,0	367	25,0	21,0	23,0
18./19. V.	8,25	1029,7	2,00	165,0	10,09	832,4	8,09	667,4	—	24,0	21,0	22,5
19./20. V.	7,51	1029,2	2,80	210,3	10,92	820,1	8,12	609,8	—	24,0	20,0	22,0
20./21. V.	6,70	1029,6	2,65	177,6	10,84	726,3	8,19	548,7	364	19,5	18,5	19,0
21./22. V.	7,99	1029,2	3,15	251,7	11,34	906,1	8,19	654,4	—	21,0	20,0	20,5
22./23. V.	7,45	1030,0	2,09	155,7	10,27	765,1	8,18	609,4	360	22,0	20,0	21,0
23./24. V.	7,42	1029,6	2,65	196,6	10,84	804,3	8,19	607,7	—	22,0	21,0	21,5
24./25. V.	5,13	1030,3	2,31	118,5	10,61	544,3	8,30	425,8	—	23,0	21,0	22,0
25./26. V.	8,66	1030,6	3,23	279,7	11,79	1021,0	8,56	741,3	—	24,0	21,0	22,5
26./27. V.	7,62	1030,6	2,53	192,8	10,95	834,4	8,42	641,6	—	26,0	21,0	23,5
27./28. V.	7,77	1030,5	2,50	194,3	10,89	846,2	8,39	651,9	368	26,0	22,0	24,0
Mittel der letzten 11 Tage . . .	7,48	1030,0	2,59	193,9	10,86	812,1	8,27	618,2	Im Mittel der ganzen Periode 363,5	—	—	—

Versuchsreihe D. **Hauptperiode IV (Grundfutter + Kartoffelflocken). Vom 28./29. Mai bis 8./9. Juni 1921.**

Tabelle LXXX.

Futterverzehr der Kuh Nr. 3 (mittleres Gewicht 378,0 kg) im Mittel pro Tag.

Ration	Trockensubstanz kg	Asche kg	Org. Substanz kg	Rohprotein kg	Reineiweiß kg	Amide kg	Rohfett kg	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe kg
5,26 kg Wiesenheu . . .	4.5810	0.3248	4,2562	0.3995	0.3637	0.0358	0.0898	1.3926	[illegible]
11,8 kg einges. Zuckerrüben	2.6289	0.1910	2,4379	0.2030	0,1192	0.0838	0.0130	0.1699	[illegible]
0,802 kg Kartoffelflocken	0.6980	0,0235	0,6745	0.0500	0,0319	0,0181	0,0018	0.0061	[illegible]
Rohnährstoffe Summe . .	7,9079	0,5393	7,3686	0,6525	0.5148	0,1377	0,1046	1,5686	[illegible]

Hierzu 106 g Salze.

Verdauliche Nährstoffe.

In der Ration	Organische Substanz %	Organische Substanz kg	Rohprotein %	Rohprotein kg	Rohfett %	Rohfett kg	Rohfaser %	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe %	N-freie Extraktstoffe kg	Stärkewert kg
Heu u. einges. Zuckerrüben	63.4	4,24	29,9	0.18	−7,8	−0,01	60,4	0.93	70.3	3.15	[illegible]
Kartoffelflocken	85	0,57	42	0.02	—	—	—	—	89	0.55	[illegible]
Verdaul. Nährstoffe Summe		4,81	—	0,20	—	−0.01	—	0.93	—	3.70	[illegible]
Pro 1000 kg Lebendgew. und Tag	—	—	—	**0,58**			—	—	—	—	9,23

Milchertrag pro Kopf und Tag . . . . 5.05 kg
„ „ 500 kg Lebendgewicht u. Tag 6.68 „

Tabelle LXXXI.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 3 in der Hauptperiode IV (Grundfutter + Kartoffelflocken).

Tag 1921	Milchmenge kg	Spezif. Gewicht	Fett %	Fett g	Trockensubst. %	Trockensubst. g	Fettfreie Trockensubst. %	Fettfreie Trockensubst. g	Gewicht der Kuh kg	Stalltemperatur Max.	Stalltemperatur Min.	Stalltemperatur Mittel
28./29. V.	6.75	1031.5	2,50	168.8	11,14	752,5	8,64	583,2	368	23.0	21.0	[illegible]
29./30. V.	6,32	1030.5	2.55	161.2	10.95	692,0	8,40	530,9	—	22.0	19.0	[illegible]
30./31. V.	5.87	1030.7	2.60	152.6	11.06	649,2	8.46	496,6	—	23.0	19.0	[illegible]
31.V./1.VI.	6.85	1030.4	2.70	184.9	11.10	760.3	8,40	575,4	376	25.0	21.0	[illegible]
1./2. VI.	6.43	1031.0	2,38	153.0	10.87	699.0	8.49	546,0	—	25.0	21.0	[illegible]
2./3. VI.	4.51	1031.3	1.60	72.2	10.01	451,5	8,41	379,3	—	27.0	23.0	[illegible]
3./4. VI.	5.95	1029,8	2.32	138.1	10.50	624,8	8.18	486,7	374	29.0	26.0	[illegible]
4./5. VI.	4,97	1029.3	3.20	159.1	11.43	568,1	8,23	409,0	—	31.0	27.0	[illegible]
5./6. VI.	4.20	1029.9	2.15	90.3	10.32	433.4	8.17	343,1	375	30.0	20.0	[illegible]
6./7. VI.	5.26	1030.0	2.29	115.7	10.40	547,0	8.20	431.3	—	24,0	19.0	[illegible]
7./8. VI.	4.65	1030.1	1.90	88.4	10,07	468.3	8,17	379.9	385	24,0	21.0	[illegible]
8./9. VI.	4.39	1029.8	2.05	90.0	10,17	446.5	8,12	356,5	390	25,0	21.0	[illegible]
Im Mittel der letzten 8 Tage . .	5.05	1030.1	2.25	113.4	10.49	529,8	8.24	416.4	Im Mittel der ganzen Periode 378.0	—	—	—

Versuchsreihe D. Grundfutterperiode V (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben + Salze). Vom 9./10. bis 24./25. Juni 1921.

Tabelle LXXXII.

Futterverzehr der Kuh Nr. 3 (mittl. Gewicht 368,4 kg) im Mittel pro Tag.

Ration	Trockensubstanz kg	Asche kg	Organ. Substanz kg	Rohprotein kg	Reineiweiß kg	Amide kg	Rohfett kg	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe kg
23 kg Wiesenheu	4,5810	0,3248	4,2562	0,3995	0,3637	0,0358	0,0898	1,3926	2,3743
1,8 kg einges. Zuckerrüben	2,5878	0,2962	2,2916	0,2089	0,0850	0,1239	0,0106	0,1994	1,8727
Rohnährstoffe Summe . .	7,1688	0,6210	6,5478	0,6084	0,4487	0,1597	0,1004	1,5920	4,2470

Hierzu 106 g Salze.

Verdauliche Nährstoffe.

In der Ration	Organische Substanz		Rohprotein		Rohfett		Rohfaser		N-freie Extraktstoffe		Stärkewert
	%	kg	%	kg	%	kg	%	kg	%	kg	kg
Verdaul. Nährstoffe Summe	63,4	4,15	28,0	0,17	−7,8	−0,01	60,4	0,96	70,3	3,03	2,78
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	—	—	—	0,46	—	—	—	—	—	—	7,55

Milchertrag pro Kopf und Tag . . . . 4,71 kg
„ „ 500 kg Lebendgewicht und Tag . . . . . 6,39 kg

Tabelle LXXXIII.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 3 in der Grundfutterperiode V (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben + Salze).

Tag 1921	Milchmenge kg	Spezifisches Gewicht	Fett		Trockensubstanz		Fettfreie Trockensubst.		Gewicht der Kuh kg	Stalltemperatur °C		
			%	g	%	g	%	g		Max.	Min.	Mittel
9./10. VI.	3,82	1029,7	2,40	91,7	10,57	403,8	8,17	312,1	390	23,0	19,0	21,0
10./11. VI.	4,81	1029,4	2,83	136,1	11,01	529,6	8,18	393,5	375	23,0	18,0	20,5
11./12. VI.	4,66	1028,2	3,77	175,7	11,83	551,3	8,06	375,6	—	21,0	19,0	20,0
12./13. VI.	5,16	1028,6	2,90	149,6	10,89	561,9	7,99	412,3	370	19,0	17,0	18,0
13./14. VI.	5,24	1029,4	2,60	136,2	10,73	562,2	8,13	426,0	—	19,0	16,0	17,5
14./15. VI.	5,41	1030,0	2,75	148,8	11,06	598,4	8,31	449,6	359	19,0	16,0	17,5
15./16. VI.	3,07	1030,2	2,60	79,8	10,93	335,5	8,33	255,7	—	21,0	16,0	18,5
16./17. VI.	6,39	1030,4	2,60	166,1	10,98	701,6	8,38	535,5	—	21,0	16,0	18,5
17./18. VI.	4,42	1029,6	2,99	132,2	11,25	497,3	8,26	365,1	363	22,0	16,0	19,0
18./19. VI.	6,04	1029,9	2,37	143,1	10,58	639,0	8,21	495,9	—	20,0	16,0	18,0
19./20. VI.	3,84	1031,1	2,35	90,2	10,86	417,0	8,51	326,8	370	18,0	16,0	17,0
20./21. VI.	4,81	1030,8	2,23	107,3	10,64	511,8	8,41	404,5	—	18,0	16,0	17,0
21./22. VI.	4,69	1030,5	2,98	139,8	11,46	537,5	8,48	397,7	370	18,0	15,0	16,5
22./23. VI.	3,88	1031,5	1,90	73,7	10,42	404,3	8,52	330,6	365	19,0	15,0	17,0
23./24. VI.	4,95	1030,5	2,46	121,8	10,84	536,6	8,38	414,8	354	19,0	16,0	17,5
24./25. VI.	3,81	1029,9	2,58	98,3	10,83	412,6	8,25	314,3	—	20,0	15,0	17,5
Im Mittel der letzten 12 Tage . .	4,71	1030,3	2,55	119,8	10,89	512,8	8,34	393,0	Im Mittel der ganz. Periode 368,4	—	—	—

Die folgenden Tabellen LXXXIV und LXXXV geben eine Übersicht über den Nährstoffgehalt der Rationen und über die Milcherträge im Vergleich mit den von *Kellner* verlangten Nährstoffmengen.

Tabelle LXXXIV.

In Versuchsreihe D, Perioden I bis V an Kuh Nr. 2 verabreichte Nährstoffmengen im Vergleich zu den *Kellner*schen Normen.

Periode	Durchschnittlich. Milchertrag pro 500 kg Lebendgewicht und Tag kg	Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag: nach unseren Ausnutzungsversuchen verabreichte Mengen an verdaul. Rohprotein kg	Stärkewert kg	*Kellner* verlangt bei dem gleichen Milchertrag Verdaul. Rohprotein kg	Stärkewert kg	Es wurden demnach in Prozenten der von *Kellner* verlangten Nährstoffmengen in Wirklichkeit verabreicht: Verdauliches Rohprotein %	Stärkewert %
I. Grundfutter	6,68	0,44	7,63	1,29	9,1	34,1	83,9
II. Grundf. + Erdnußkuch.	8,05	1,40	9,25	1,49	9,7	94,0	95,4
III. Grundf. + Harnstoff + Kartoffelfl.	7,65	1,60	9,58	1,42	9,5	112,7	100,8
IV. Grundf. + Kartoffelfl.	6,50	0,54	9,50	1,29	9,1	41,9	104,4
V. Grundfutt.	6,61	0,46	7,79	1,29	9,1	35,7	85,6

Tabelle LXXXV.

In Versuchsreihe D, Perioden I bis V an Kuh Nr. 3 verabreichte Nährstoffmengen im Vergleich zu den *Kellner*schen Normen.

Periode	Durchschnittlich. Milchertrag pro 500 kg Lebendgewicht und Tag kg	Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag: nach unseren Ausnutzungsversuchen verabreichte Mengen an verdaul. Rohprotein kg	Stärkewert kg	*Kellner* verlangt bei dem gleichen Milchertrag verdaul. Rohprotein kg	Stärkewert kg	Es wurden demnach in Prozenten der von *Kellner* verlangten Nährstoffmengen in Wirklichkeit verabreicht: verdauliches Rohprotein %	Stärkewert %
I. Grundfutter	10,38	0,42	7,27	1,82	10,75	23,1	67,3
II. Grundf. + Erdnußkuch.	12,50	1,37	9,06	2,12	11,75	64,6	77,1
III. Grundf. + Harnstoff + Kartoffelfl.	10,29	1,60	9,44	1,82	10,75	87,9	87,8
IV. Grundf. + Kartoffelfl.	6,68	0,53	9,23	1,29	9,1	41,1	101,4
V. Grundfutt.	6,39	0,46	7,55	1,29	9,1	35,7	83,0

Wir ersehen aus den vorstehenden Tabellen, daß die verabreichten Mengen an verdaulichem Rohprotein und Stärkewert zumeist stark hinter den *Kellner*schen Normen zurückbleiben. Insbesondere trifft das für die milchergiebigere Kuh Nr. 3 zu, die in der I. Grundfutterperiode nur rund 33% des verdaulichen Rohproteins und 67% des Stärkewertes der verlangten Mengen erhielt. In der Harnstoff-Kartoffelflockenperiode III stieg die Nährstoffzufuhr bei der Kuh Nr. 3 auf 88% der erforderlichen Mengen an Rohprotein und Stärkewert und bei der Kuh Nr. 2 auf 113% an verdaulichem Rohprotein und 100% an Stärkewert. Die Zahlen für die Milcherträge zeigen bei der milchergiebigeren Kuh Nr. 3 stark fallende Tendenz, während die Kuh Nr. 2 in der Grundfutterperiode V nur unwesentlich geringere Mengen an Milch und Milchtrockensubstanz sezernierte als in der Periode I (siehe die folgenden Tabellen LXXXVI—LXXXIX).

Tabelle LXXXVI.

Durchschnittliche Erträge an Milch und Milchbestandteilen in Versuchsreihe D, Perioden I bis V von der Kuh Nr. 2.

Periode	Milchmenge	Trockensubstanz		Asche		Organische Substanz		Protein (N · 6,26)		Fett		Milchzucker und andere stickstoffreie organische Stoffe	
	kg	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g
I. Grundfutter . . .	6,32	11,43	722,5	0,72	45,6	10,71	676,9	2,71	171,3	2,90	183,1	5,10	322,5
II. Grundfutter + Erdnußkuchen	7,35	11,73	862,3	0,73	53,6	11,00	808,7	2,71	199,2	3,16	232,5	5,13	377,0
III. Grundfutter + Kartoffelflocken + Harnstoff . . .	6,98	11,66	813,6	0,73	50,8	10,93	762,8	2,80	195,4	3,06	213,7	5,07	353,7
IV. Grundfutter + Kartoffelflocken	6,07	11,76	714,1	0,72	43,9	11,04	670,2	2,71	164,5	3,10	188,0	5,23	317,7
V. Grundfutter . . .	6,01	11,74	705,5	0,72	43,2	11,02	662,3	2,80	168,3	3,14	188,7	5,08	305,3
Erträge an Milch und Milchbestandteilen *aus dem Grundfutter**) in den Hauptperioden II, III und IV.													
II.	6,25	11,42	714,0	0,71	44,4	10,71	669,6	2,72	169,8	2,97	185,9	5,02	313,9
III.	6,15	11,61	714,0	0,72	44,4	10,89	669,6	2,76	169,8	3,02	185,9	5,11	313,9
IV.	6,08	11,74	714,0	0,73	44,4	11,01	669,6	2,79	169,8	3,06	185,9	5,16	313,9

*) Über die Berechnung vergleiche S. 334. Gesamtunterschied zwischen der Mitte der Perioden I und V ist hier 60 Tage, der Abstand von der Mitte I bis II 12,5 Tage = 20,8%, von Mitte I bis Mitte II 32,5 Tage = 54,2% und von Mitte I bis Mitte IV 46,0 Tage = 76,7% des Gesamtunterschiedes.

Tabelle LXXXVII.

Mehrerträge an Milch und Milchbestandteilen durch die Zulagen in den Hauptperioden II, III und IV von der Kuh Nr. 2.

Milchertrag aus:	Milchmenge kg	Trockensubst. %	Trockensubst. g	Asche %	Asche g	Organ. Substanz %	Organ. Substanz g	Protein %	Protein g	Fett %	Fett g	Milchzucker und andere N-freie organische Stoffe %	Milchzucker und andere N-freie organische Stoffe g
Periode II „Erdnußkuchen".													
Grundfutter + Erdnußkuchen	7,35	11,73	862,3	0,73	53,6	11,00	808,7	2,71	199,2	3,16	232,5	5,13	377,0
Grundfutter allein	6,25	11,42	714,0	0,71	44,4	10,71	669,6	2,72	169,8	2,97	185,9	5,02	313,9
Aus 1 kg Erdnußkuchen	1,10	13,48	148,3	0,83	9,2	12,65	139,1	2,67	29,4	4,24	46,6	5,74	63,1
Periode III „Harnstoff + Kartoffelflocken".													
Grundfutter + Harnstoff + Kartoffelflocken	6,98	11,66	813,6	0,73	50,8	10,93	762,8	2,80	195,4	3,06	213,7	5,07	353,7
Grundfutter allein	6,15	11,61	714,0	0,72	44,4	10,89	669,6	2,76	169,8	3,02	185,9	5,11	313,9
Aus 1,02 kg Kartoffelflocken + 0,1776 kg Harnstoff	0,83	12,00	99,6	0,77	6,4	11,23	93,2	3,08	25,6	3,35	27,8	4,80	39,8
In Prozenten des Ertrages aus 1 kg Erdnußkuchen	75,5%	67,2%		69,6%		67,0%		87,1%		59,7%		63,1%	
Periode IV „Kartoffelflocken".													
Grundfutter + Kartoffelflocken	6,07	11,76	714,1	0,72	43,9	11,04	670,2	2,71	164,5	3,10	188,0	5,23	317,7
Grundfutter allein	6,08	11,74	714,0	0,73	44,4	11,01	669,6	2,79	169,8	3,06	185,9	5,16	313,9
Aus 1,02 kg Kartoffelflocken	0,01		0,1	-	0,5	-	0,6		5,3		2,1		3,8

Tabelle LXXXVIII.

Durchschnittliche Erträge an Milch und Milchbestandteilen in Versuchsreihe D, Perioden I bis V von der Kuh Nr. 3.

Periode	Milchmenge	Trockensubstanz		Asche		Organische Substanz		Protein N · 6,25		Fett		Milchzucker und andere N-freie, organische Stoffe	
	kg	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g
I. Grundfutter (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben)	7,85	10,72	841,4	0,70	54,9	10,02	786,5	2,33	182,7	2,34	183,8	5,35	420,0
II. Grundfutter + Erdnußkuchen	9,13	10,85	990,3	0,69	62,8	10,16	927,5	2,25	205,2	2,59	236,8	5,32	485,5
III. Grundfutter + Kartoffelflocken + Harnstoff	7,48	10,86	812,1	0,71	53,1	10,15	759,0	2,42	181,0	2,59	193,9	5,14	384,1
IV. Grundfutter + Kartoffelflocken	5,05	10,49	529,8	0,73	36,9	9,76	492,9	2,50	126,2	2,25	113,4	5,01	253,3
V. Grundfutter	4,71	10,89	512,8	0,71	33,4	10,18	479,4	2,59	122,0	2,55	119,8	5,04	237,6
Erträge an Milch und Milchbestandteilen *aus dem Grundfutter**) in den Hauptperioden II, III und IV.													
II.	7,22	10,71	773,0	0,70	50,5	10,01	722,5	2,36	170,2	2,36	170,6	5,29	381,7
III.	6,16	10,77	663,5	0,70	43,3	10,07	620,2	2,43	149,9	2,42	149,2	5,22	321,1
IV.	5,45	10,82	589,6	0,70	38,4	10,12	551,2	2,50	136,2	2,48	134,8	5,14	280,2

*) Über die Berechnung vergl. S. 334. Der Abstand der Mitte der Perioden I bis V beträgt hier 59,5 Tage. Der Abstand von Mitte I bis Mitte II = 12,0 Tage = 20,2%, derjenige von Mitte I bis Mitte III 32,0 Tage = 53,8% und der von Mitte I bis Mitte IV 45,5 Tage = 76,5% des Gesamtunterschiedes.

Tabelle LXXXIX.

Mehrerträge an Milch und Milchbestandteilen durch die Zulagen in den Hauptperioden II, III und IV von der Kuh Nr. 3.

Milchertrag aus	Milchmenge	Trockensubstanz		Asche		Organische Substanz		Protein		Fett		Milchzucker und andere stickstofffreie organische Stoffe	
	kg	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g
Periode II. Erdnußkuchen.													
Grundfutter + Erdnußkuchen	9,13	10,85	990,3	0,69	62,8	10,16	927,5	2,25	205,2	2,59	236,8	5,32	485,5
Grundfutter allein	7,22	10,71	773,0	0,70	50,5	10,01	722,5	2,36	170,2	2,36	170,6	5,29	381,7
Aus 0,786 kg Erdnußkuchen	1,91	11,38	217,3	0,64	12,3	10,74	205,0	1,83	35,0	3,47	66,2	5,44	103,8
Aus 1 kg Erdnußkuchen	2,43	11,38	276,5	0,64	15,7	10,74	260,8	1,83	44,5	3,47	84,2	5,44	132,1
Periode III. Harnstoff + Kartoffelflocken.													
Grundfutter + Harnstoff + Kartoffelflocken	7,48	10,86	812,1	0,71	53,1	10,15	759,0	2,42	181,0	2,59	193,9	5,14	384,1
Grundfutter allein	6,16	10,77	663,5	0,70	43,3	10,07	620,2	2,43	149,9	2,42	149,2	5,22	321,1
Aus 0,1396 kg Harnstoff + 0,802 kg Kartoffelflocken	1,32	11,26	148,6	0,74	9,8	10,52	138,8	2,36	31,1	3,39	44,7	4,77	63,0
Aus 0,1776 kg Harnstoff + 1,02 kg Kartoffelflocken	1,68	11,26	189,0	0,74	12,4	10,52	176,6	2,36	39,6	3,39	56,9	4,77	80,1
In Prozenten des Ertrages aus 1 kg Erdnußkuchen . . . %	69,1	68,4		79,0		67,8		89,0		67,6		60,7	
Periode IV. Kartoffelflocken.													
Grundfutter + Kartoffelflocken	5,05	10,49	529,8	0,73	36,9	9,76	492,9	2,50	126,2	2,25	113,4	5,01	253,3
Grundfutter allein	5,45	10,82	589,6	0,70	38,4	10,12	551,2	2,50	136,2	2,48	134,8	5,14	280,2
Aus 0,802 kg Kartoffelflocken	−0,4	—	−59,8	—	−1,5		−58,3		−10,0	—	−21,4		26,9

Zum Vergleich der Wirkung eines proteinreichen Futtermittels gegenüber derjenigen von Harnstoff und einem eiweißarmen Futterstoff (Zuckerrüben bzw. Kartoffelflocken) auf die Milchleistung sind in der folgenden Tabelle die diesbezüglichen Daten aus den Versuchsreihen C und D zusammengestellt.

Tabelle LXXXIX a.

Versuchsreihe	Kuh Nr.	Periode Nr.	Milchertrag aus:	Milchmenge kg	Milchtrockensubstanz g
C	Im Mittel von Kuh 1, 3 und 4	V	1 kg Erdnußkuchen . . .	2,14	287,3
		IV	171,0 g Harnstoff + 4,34 kg Zuckerrüben . .	1,19	153,7
			In Prozenten des Ertrages aus 1 kg Erdnußkuchen	**55,6%**	**53,5%**
D	2	II	1 kg Erdnußkuchen . . .	1,10	148,3
		III	177,6 g Harnstoff + 1,02 kg Kartoffelflocken	0,83	99,6
			In Prozenten des Ertrages aus 1 kg Erdnußkuchen	**75,5%**	**67,2%**
	3	II	1 kg Erdnußkuchen . . .	2,43	276,5
		III	177,6 g Harnstoff + 1,02 kg Kartoffelflocken	1,68	189,0
			In Prozenten des Ertrages aus 1 kg Erdnußkuchen	**69,1%**	**68,4%**

Die Kuh Nr. 2, welche überhaupt nur wenig Milch gab, ließ nur einen geringen Effekt der Kraftfutterzulagen auf die Milchsekretion erkennen. Die Milcherträge waren nur etwa halb so groß wie bei der Kuh Nr. 3. Im Verhältnis zueinander lieferten die Kraftfutterzulagen allerdings auch hier annähernd die gleichen Erträge wie bei der Kuh Nr. 3. Bei letzterer stimmen auch die durch die Erdnußkuchen erzielten absoluten Mehrerträge annähernd überein mit den diesbezüglichen Ergebnissen an den 3 Kühen Nr. 1, 3 und 4 in der Versuchsreihe C. Im Mittel der 3 Kühe wurden nämlich durch 1 kg Erdnußkuchen mehr sezerniert

2,14 kg Milch und 287,3 g Milchtrockensubstanz.

Für die Kuh Nr. 3 in Versuchsreihe D waren die betreffenden Zahlen

2,43 kg Milch und 276,5 g Milchtrockensubstanz.

Aus 1,02 kg Kartoffelflocken und 0,1776 kg Harnstoff mit dem berechneten gleichen Gehalt an verdaulichem Rohprotein und Stärkewert wie 1 kg Erdnußkuchen sezernierte die Kuh Nr. 3 1,68 kg Milch und 189,0 g Milchtrockensubstanz. Der Effekt der Zuckerrüben, Versuchsreihe C, an Stelle der Kartoffelflocken war in Kombination mit Harnstoff auf die Milchleistung geringer, er betrug im Mittel der 3 Kühe:

1,19 kg Milch und 153,7 g Milchtrockensubstanz.

Setzen wir die Mehrerträge an Milch und Milchtrockensubstanz aus den Erdnußkuchen = 100, so betragen dieselben in der Kombination

Kartoffelflocken und Harnstoff bei der Kuh Nr. 2 für die Milch 75,5%, und für die Milchtrockensubstanz 67,2%, bei der Kuh Nr. 3 entsprechend 69,1 und 68,4%. In der Versuchsreihe C wurde dagegen aus Harnstoff und Zuckerrüben im Vergleich zu Erdnußkuchen im Mittel der 3 Kühe nur erhalten:

55,6% der Milchmenge und 53,5% der Trockensubstanzmenge.

Die Gründe für die Minderwirkung des Harnstoffs im Gemisch mit Zuckerrüben haben wir auf S. 373 dargelegt. Im wesentlichen kommt für dieselbe die ungünstige Stellung der Harnstoff-Zuckerrübenperiode in der Versuchsreihe C in Betracht. Die Wirkung der Kartoffelflocken *ohne* Harnstoff auf die Milchleistung war bei der Kuh Nr. 2 gleich Null, während sich bei der Kuh Nr. 3 sogar negative Werte ergaben. Hieraus ist zu schließen, daß die Steigerung der Milchleistung durch die Kartoffelflocken-Harnstoffzulage in der Periode III allein dem Harnstoff zuzuschreiben ist, und weiter, daß die Milchdrüsen hier nur sehr schwach auf Kraftfutterzulagen reagierten, andernfalls hätten auch die Kartoffelflocken allein die Milcherträge etwas steigern müssen. So haben wir früher[1]) bei 4 Kühen aus gekochten Kartoffeln, berechnet auf die gleiche Trockensubstanzmenge von 0,8878 kg, wie sie hier verabreicht wurde, 0,41 kg Milch mit 52,9 g Trockensubstanz erzielt. Erwähnen wollen wir schließlich noch, daß nach rechnerischer Ausschaltung des Einflusses der abfallenden Lactation (siehe die folgenden Tabellen XC u. XCI) die Wirkung der Kombination Harnstoff-Kartoffelflocken im Vergleich zu Erdnußkuchen betrug:

bei Kuh Nr. 2 76,6% der Milchmenge, 67,2% der Milchtrockensubstanz
bei Kuh Nr. 3 80,8% der Milchmenge, 79,7% der Milchtrockensubstanz.

Tabelle XC. Wahrscheinliche Erträge an Milch und Milchbestandteilen aus Erdnußkuchen bezw. Harnstoff und Kartoffelflocken bei der Kuh Nr. 2 nach rechnerischer Ausschaltung des Einflusses der Lactation.

Ertrag aus:	Milchmenge kg	Trock.-Subst. g	Asche g	Organ. Subst. g	Protein g	Fett g	Milchz. u. N-fr. org. St. g
Periode II. Erdnußkuchen.							
Grundfutter + Erdnußkuchen	7,43	872,6	55,1	817,5	201,0	229,0	387,5
Grundfutter allein	6,32	722,5	45,6	676,9	171,3	183,1	322,5
Aus 1 kg Erdnußkuchen	1,11	150,1	9,5	140,6	29,7	45,9	65,0
Periode III. Harnstoff + Kartoffelflocken.							
Grundfutter + Harnstoff + Kartoffelflock.	7,17	823,3	52,2	771,1	197,1	210,5	363,5
Grundfutter allein	6,32	722,5	45,6	676,9	171,3	183,1	322,5
Aus 1,02 kg Kartoffelflocken u. 0,1776 kg Harnstoff	0,85	100,8	6,6	94,2	25,8	27,4	41,0
In Prozent. der Erdnußkuchenwirkung %	76,6	67,2	69,4	67,0	86,8	59,7	63,1

[1]) *W. Völtz* und *W. Dietrich*, Die Verwertung roher, gedämpfter usw. Kartoffeln für die Milchleistung. Landw. Jahrbücher **48**, 535—569. 1915.

Tabelle IXC.

Wahrscheinliche Erträge an Milch und Milchbestandteilen aus Erdnußkuchen bezw. Harnstoff und Kartoffelflocken von der Kuh Nr. 3 nach rechnerischer Ausschaltung des Einflusses der Lactation.

Milchertrag aus	Milchmenge kg	Trockensubstanz g	Asche g	Organ. Substanz g	Protein g	Fett g	Milchzucker u. andere N-freie, organ. Stoffe g
			Periode II. Erdnußkuchen.				
ndfutter + Erdnußkuchen	9,93	1077,9	63,3	1009,6	220,3	255,1	534,2
ndfutter allein	7,85	841,4	54,9	785,5	182,7	183,8	420,0
0,786 kg Erdnußkuchen	2,08	236,5	13,4	223,1	37,6	71,3	114,2
1 kg Erdnußkuchen.	2,65	300,9	17,1	283,8	47,8	90,7	145,3
			Periode III. Harnstoff + Kartoffelflocken.				
ndfutter + Harnstoff + Kartoffelocken	9,53	1029,8	67,3	962,5	220,6	238,9	503,0
ındfutter allein	7,85	841,4	54,9	786,5	182,7	183,8	420,0
s 0,802 kg Kartoffelflocken + 0,1396 kg Harnstoff	1,68	188,4	12,4	176,0	37,9	55,1	83,0
s 1,02 kg Kartoffelflocken + 0,1776 kg Harnstoff	2,14	239,7	15,8	223,9	48,2	70,1	105,6
Prozenten des Ertrages aus 1 kg Erdnußkuchen . . . . %	80,8	79,7	92,4	78,9	100,8	77,3	72,0

Anschließend teilen wir in der Tabelle VIIIC die Gewichtsveränderungen der Kühe Nr. 2 und 3 während der einzelnen Perioden mit.

Tabelle VIIIC.

Gewichtsveränderungen der Kühe Nr. 2 u. 3 während der Perioden I bis V.

h Nr.	Periode	Dauer Tage	Anfangsgewicht kg	Endgewicht kg	Anzahl der Wägungen	Durchschnittsgewicht aus allen Wägungen kg	Tägl. Gewichtszunahme (+) od. -Abnahme (−) kg
2	I. Grundfutter (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben	14	483,0	480,0	6	473,0	−**0,21**
3		14	377,0	390,0	6	378,2	+**0,98**
ı Mittel von 2 und 3		—	430,0	435,0	—	425,6	+**0,36**
2	II. Grundfutter + Erdnußkuchen	12	480,0	440,0	7	456.4	−**3,33**
3		12	390,0	357,0	7	365,3	−**2,75**
n Mittel von 2 und 3		—	435,0	398,5	—	410,9	−**3,04**
2	III. Grundfutter + Kartoffelflocken + Harnstoff	21	440,0	453,0	9	456,3	+**0,62**
3		21	357,0	368,0	9	363.5	+**0,52**
n Mittel von 2 und 3		—	398,5	410,5	—	409,9	+**0,57**
2	IV. Grundfutter + Kartoffelflocken	12	453,0	470,0	6	467,2	+**1,42**
3		12	368,0	390,0	6	378,0	+**1,83**
m Mittel von 2 und 3		—	410,5	430,0	—	422,6	+**1,63**
2	V. Grundfutter	16	470,0	450,0	9	454,4	−**1,25**
3		16	390,0	354,0	9	368,4	−**2,25**
m Mittel von 2 und 3		—	430,0	402,0	—	411,4	−**1,75**

Gewichtsverluste sind in der Erdnußkuchenperiode II und in der abschließenden Grundfutterperiode V bei beiden Kühen festzustellen. In der Erdnußkuchenperiode II betrugen die täglichen Gewichtsverluste im Mittel pro Kopf 3,04 kg. Diese Gewichtsverluste sind nicht unbeträchtlich, die Abnahme des Gewichtes der Kühe erfolgte ziemlich regelmäßig und übereinstimmend. Da in der unmittelbar auf die Erdnußkuchenperiode folgenden 3 wöchentlichen Harnstoffperiode bei beiden Kühen eine wenn auch nicht starke, so doch regelmäßige Zunahme von 0,5 bzw. 0,6, im Mittel 0,57 kg pro Tag festgestellt wurde, könnte man geneigt sein, zu schließen, daß der Mehrertrag aus den Erdnußkuchen im Vergleich zu Harnstoff und Kartoffelflocken nicht aus den Erdnußkuchen, sondern aus zersetztem Körpereiweiß bestritten worden und somit ein höherer Futterwert der Erdnußkuchen gegenüber Harnstoff und Kartoffelflocken für die Milchleistung nicht zu folgern sei. Wir wollen diesen Schluß jedoch nicht ziehen im Hinblick auf die vielen Faktoren, welche beim Wiederkäuer die Feststellung des jeweiligen Bestandes an Körpersubstanz durch einfache Wägung der Tiere erschweren.

Die Zulage von Kartoffelflocken allein in der Periode IV bedingte bei entsprechend verminderter Milchsekretion bei beiden Kühen eine durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme von 1,4 bzw. 1,8 kg bzw. im Mittel von 1,63 kg pro Kopf und Tag. Die Kartoffelnährstoffe, welche hier, wie wir sahen, keinen Einfluß auf die Milchbildung hatten, wurden offenbar für den Ansatz verwandt. Nach der Entziehung der Kartoffelzulagen verloren die Kühe in der abschließenden Grundfutterperiode V täglich im Durchschnitt 1,75 kg von ihrem Körpergewicht.

Versuche an der Kuh Nr. 4.

Es handelt sich bei den folgenden Perioden (Periode I Grundfutter, Periode II Grundfutter + Erdnußkuchen, Periode III Grundfutter + Kartoffelflocken + Harnstoff), wie oben ausgeführt, um Bilanzversuche, in denen die Kuh nur rund 75% ihrer früheren Ration erhielt. Die abschließende Grundfutterperiode IVa, in der das Versuchstier nicht mehr mit den Stoffwechselapparaten ausgerüstet war, wurde zur Feststellung der abfallenden Milchsekretion durchgeführt. Dieser Abfall der Milchleistung war teils infolge vorgeschrittener Lactation, in der Hauptsache aber infolge unzureichender Nahrungszufuhr, ein sehr starker. In der Grundfutterperiode I sezernierte das Tier nämlich täglich im Mittel 4,85 kg Milch, in der abschließenden Grundfutterperiode IVa dagegen nur noch 2,38 kg, also kaum die Hälfte. Die folgenden Tabellen VIIC bis CIV enthalten die Zahlen über den Futterverzehr, über die Erträge an Milch und ihren Bestandteilen aus dem Grundfutter und aus den Kraftfutterzulagen und schließlich die wahrscheinlichen Milcherträge nach rechnerischer Ausschaltung des Einflusses der Lactation.

Tabelle XCIII.

Erträge an Milch*) und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 4 Grundfutterperiode I (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben + Salze).

Tag 1921	Milchmenge kg	Spezif. Gewicht	Fett		Trockensubstanz		Fettf. Trockensubstanz		Gewicht der Kuh kg	Stalltemperatur °C		
			%	g	%	g	%	g		Max.	Min.	Mittel
28./29. IV.	4,60	1030,3	3,37	155,0	11,88	546,5	8,51	391,5	305	20,0	17,0	18,5
29./30. IV.	4,71	1029,0	3,31	155,9	11,48	540,7	8,17	384,8	—	20,0	16,0	18,0
30. IV./1. V.	4,86	1029,3	3,73	181,3	12,06	586,1	8,33	404,8	—	20,0	16,0	18,0
1./2. V.	4,94	1029,3	3,48	171,9	11,76	580,9	8,28	409,0	—	20,0	16,0	18,0
2./3. V.	4,94	1029,8	3,88	191,7	12,37	611,1	8,49	419,4	—	20,0	16,0	18,0
3./4. V.	4,87	1029,6	3,75	182,6	12,16	592,2	8,41	409,6	—	19,0	15,0	17,0
4./5. V.	4,92	1029,9	3,72	183,0	12,20	600,2	8,48	417,2	—	18,0	15,0	16,5
5./6. V.	4,93	1029,5	3,82	188,3	12,22	602,4	8,40	414,1	307	17,0	13,0	15,0
Im Mittel . .	4,85	1029,6	3,63	176,2	12,01	582,5	8,38	406,3	306	—	—	—

*) Den Futterverzehr siehe auf Seite 379.

Tabelle XCIV.

Erträge an Milch*) und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 4 in der Hauptperiode II (Grundfutter + Erdnußkuchen).

Tag 1921	Milchmenge kg	Spezif. Gewicht	Fett		Trockensubstanz		Fettf. Trockensubstanz		Gewicht der Kuh kg	Stalltemperatur °C		
			%	g	%	g	%	g		Max.	Min.	Mittel
18./19. V.	4,72	1029,4	3,62	170,9	11,96	564,5	8,34	393,6	310	24,0	21,0	22,5
19./20. V.	4,64	1028,6	3,60	167,0	11,73	544,3	8,13	377,3	—	24,0	20,0	22,0
20./21. V.	4,70	1029,4	3,60	169,2	11,93	560,7	8,33	391,5	—	19,5	18,5	19,0
21./22. V.	4,82	1029,9	3,70	178,3	12,18	587,1	8,48	408,8	—	21,0	20,0	20,5
22./23. V.	4,98	1029,8	3,67	182,8	12,12	603,6	8,45	420,8	—	22,0	20,0	21,0
23./24. V.	4,89	1029,8	3,68	180,0	12,13	593,2	8,45	413,2	—	22,0	21,0	21,5
24./25. V.	5,13	1030,0	3,82	196,0	12,35	633,6	8,53	437,6	—	23,0	21,0	22,0
25./26. V.	4,70	1030,4	3,87	181,9	12,51	588,0	8,64	406,1	315	24,0	21,0	22,5
Im Mittel . .	4,82	1029,7	3,70	178,3	12,12	584,4	8,42	406,1	312,5	—	—	—

*) Den Futterverzehr siehe auf Seite 382.

Tabelle XCV.

Erträge an Milch*) und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 4 in der Hauptperiode III (Grundfutter + Harnstoff + Kartoffelflocken).

Tag 1921	Milchmenge kg	Spezif. Gewicht	Fett		Trockensubstanz		Fettf. Trockensubstanz		Gewicht der Kuh kg	Stalltemperatur °C		
			%	g	%	g	%	g		Max.	Min.	Mittel
13./14. VI.	3,95	1030,5	3,65	144,2	12,27	484,7	8,62	340,5	300	19,0	16,0	17,5
14./15. VI.	3,92	1030,7	4,12	161,5	12,88	504,9	8,76	343,4	—	19,0	16,0	17,5
15./16. VI.	3,90	1030,2	3,95	154,0	12,55	489,4	8,60	335,4	—	21,0	16,0	18,5
16./17. VI.	3,92	1029,8	4,18	163,9	12,73	499,0	8,55	335,1	—	21,0	16,0	18,5
17./18. VI.	3,54	1030,5	3,98	140,9	12,66	448,2	8,68	307,3	—	22,0	16,0	19,0
18./19. VI.	3,81	1030,6	4,20	160,0	12,95	493,4	8,75	333,4	—	20,0	16,0	18,0
19./20. VI.	3,53	1030,1	4,03	142,3	12,62	445,5	8,59	303,2	—	18,0	16,0	17,0
20./21. VI.	3,51	1030,1	4,30	150,9	12,95	454,5	8,65	303,6	310	18,0	16,0	17,0
Im Mittel . .	3,76	1030,3	4,05	152,2	12,70	477,4	8,65	325,2	305	—	—	—

*) Den Futterverzehr siehe auf Seite 384.

Versuchsreihe D. Grundfutterperiode IVa (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben + Salze).
Vom 21./22. Juni bis 3./4. Juli 1921.

Tabelle XCVI.

Futterverzehr der Kuh Nr. 4 (mittleres Gewicht 305,0 kg) im Mittel pro Tag.

Ration	Trocken-substanz kg	Asche kg	Organ. Sub-stanz kg	Roh-protein kg	Rein-eiweiß kg	Amide kg	Roh-fett kg	Roh-faser kg	N-freie Extraktstoffe kg
3,92 kg Wiesenheu . . .	3,4360	0,2436	3,1924	0,2996	0,2728	0,0268	0,0674	1,0445	1,78[illegible]
8,85 kg eingesäuerte Zuckerrüben	2,0320	0,2080	1,8240	0,1549	0,0628	0,0921	0,0079	0,1567	1,50[illegible]
Rohnährstoffe Summe . .	5,4680	0,4516	5,0164	0,4545	0,3356	0,1189	0,0753	1,2012	3,28[illegible]

Hierzu 106 g Salze.

Verdauliche Nährstoffe.

In der Ration	Organische Substanz %	Organische Substanz kg	Roh-protein %	Roh-protein kg	Rohfett %	Rohfett kg	Rohfaser %	Rohfaser kg	N-freie Extraktstoffe %	N-freie Extraktstoffe kg	Stärkewert kg
Verdaul. Nährstoffe Summe	63,4	3,18	26,4	0,12	−7,8	—	60,4	0,73	70,3	2,33	2,16
Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag	—	—	—	**0,39**	—	—	—	—	—	—	7,08

Milchertrag pro Kopf und Tag . . . . 2,38 kg
" " 500 kg Lebendgewicht und Tag . . . . . 3,90 kg

Tabelle XCVII.

Erträge an Milch und Milchbestandteilen von der Kuh Nr. 4 in der Grundfutterperiode IVa (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben + Salze).

Tag 1921	Milch-menge kg	Spezi-fisches Ge-wicht	Fett %	Fett g	Trocken-substanz %	Trocken-substanz g	Fettfreie Trockensub-stanz %	Fettfreie Trockensub-stanz g	Gewicht der Kuh kg	Stalltemperatur Max.	Stalltemperatur Min.	Stalltemperatur Mittel
21./22. VI.	3,35	1030,0	4,05	135,7	12,62	422,8	8,57	287,1	310	18,0	15,0	[illegible]
22./23. VI.	3,23	1029,6	4,50	145,3	13,06	421,8	8,56	276,5	—	19,0	15,0	[illegible]
23./24. VI.	2,76	1029,6	3,73	103,0	12,14	335,1	8,41	232,1	293	19,0	16,0	[illegible]
24./25. VI.	3,16	1029,0	4,60	145,4	13,03	411,8	8,43	266,4	306	20,0	15,0	[illegible]
25./26. VI.	2,87	1028,9	3,98	114,2	12,26	351,9	8,28	237,7	—	22,0	16,0	[illegible]
26./27. VI.	2,83	1029,2	3,85	109,0	12,18	344,7	8,33	235,7	—	24,0	21,0	[illegible]
27./28. VI.	2,39	1028,1	4,03	96,3	12,12	289,7	8,09	193,4	—	22,0	18,0	[illegible]
28./29. VI.	2,11	1028,9	4,13	87,1	12,44	262,5	8,31	175,4	312	20,0	17,0	[illegible]
29./30. VI.	2,19	1028,8	4,32	94,6	12,64	276,8	8,32	182,2	321	19,0	16,0	[illegible]
30. VI./1. VII.	2,56	1029,4	3,57	91,4	11,90	304,6	8,33	213,2	—	19,0	16,0	[illegible]
1./2. VII.	2,59	1029,8	3,64	94,3	12,08	312,9	8,44	218,6	303	19,0	17,0	[illegible]
2./3. VII.	2,37	1029,3	3,59	85,1	11,89	281,8	8,30	196,7	—	21,0	17,0	[illegible]
3./4. VII.	2,48	1028,8	3,72	92,2	11,92	295,6	8,20	203,4	290	24,0	19,0	[illegible]
Im Mittel der letzten 7 Tage	2,38	1029,1	3,85	91,6	12,15	289,1	8,30	197,5	Im Mittel der ganzen Periode 305,0	—	—	—

Tabelle XCVIII.

In der **Versuchsreihe D, (Perioden I—IVa)** an die Kuh Nr. 4 verabreichte Nährstoffmengen im Vergleich zu den *Kellner*schen Normen.

Periode	Durchschnittlicher Milchertrag pro 500 kg Lebendgewicht u. Tag	Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag: nach unsern Ausnutzungsversuchen verabreichte Mengen an		Pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag: *Kellner* verlangt bei dem gleichen Milchertrag		Es wurden demnach in Proz. der von *Kellner* verlangten Nährstoffmengen in Wirklichkeit verabr.	
		verdaulichem Rohprotein	Stärkewert	verdauliches Rohprotein	Stärkewert	verdauliches Rohprotein	Stärkewert
	kg	kg	kg	kg	kg	%	%
I. Grundfutter	7,93	0,42	7,06	1,49	9,7	28,2	72,8
II. Grundfutter + Erdnußkuchen	7,71	1,21	7,57	1,42	9,5	85,2	79,7
III. Grundfutter + Harnstoff + Kartoffelflocken	6,16	1,38	8,59	1,23	8,9	112,2	96,5
IV a. Grundfutter	3,90	0,39	7,08	0,88	8,1	44,3	87,4

Tabelle XCIX.

Durchschnittliche Erträge an Milch und Milchbestandteilen in Versuchsreihe D, (Perioden I—IV a) von der Kuh Nr. 4.

Periode	Milchmenge	Trockensubstanz		Asche		Organische Substanz		Protein (N·6,25)		Fett		Milchzucker u. andere N-freie, organ. Stoffe	
	kg	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g
I. Grundfutter (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben)	4,85	12,01	582,5	0,68	33,0	11,33	549,5	2,58	125,1	3,63	176,2	5,12	248,2
II. Grundfutter + Erdnußkuchen . .	4,82	12,12	584,4	0,70	33,7	11,42	550,7	2,61	125,8	3,70	178,3	5,11	246,6
III. Grundfutter + Kartoffelflocken + Harnstoff	3,76	12,70	477,4	0,71	26,7	11,99	450,7	3,04	114,3	4,05	152,2	4,90	184,2
IV a. Grundfutter	2,38	12,15	289,1	0,70	16,6	11,45	272,5	2,88	68,6	3,85	91,6	4,72	112,3
Erträge an Milch und Milchbestandteilen aus dem *Grundfutter**) in den Hauptperioden II und III.													
II.	4,02	12,04	483,9	0,69	27,5	11,35	456,4	2,64	106,1	3,67	147,7	5,04	202,6
III.	2,94	12,10	355,7	0,69	20,3	11,41	335,4	2,78	81,7	3,77	110,7	4,86	143,0

*) Über die Berechnung siehe S. 334. Der Gesamtunterschied zwischen den Mitten der Perioden I und IV beträgt hier 59,5 Tage. Der Abstand von Mitte I bis Mitte II ist 20 Tage = 33,6%, der Abstand von Mitte I bis Mitte III 46 Tage = 77,3% des Gesamtunterschiedes.

Tabelle C.

Mehrerträge an Milch und Milchbestandteilen durch die Zulagen in den Hauptperioden II und III von der Kuh Nr. 4.

Milchertrag aus	Milchmenge	Trockensubstanz		Asche		Organische Substanz		Protein		Fett		Milchzucker und N-freie organ. Stoffe	
	kg	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g
Periode II. Erdnußkuchen.													
Grundf. + Erdnußkuchen	4,82	12,12	584,4	0,70	33,7	11,42	550,7	2,61	125,8	3,70	178,3	5,11	24[illegible]
Grundf. allein	4,02	12,04	483,9	0,69	27,5	11,35	456,4	2,64	106,1	3,67	147,7	5,04	2[illegible]
Aus 0,5895 kg Erdnußkuchen	0,80	12,56	100,5	0,77	6,2	11,79	94,3	2,46	19,7	3,83	30,6	5,50	4[illegible]
Aus 1 kg Erdnußkuchen	1,36	12,54	170,5	0,77	10,5	11,77	160,0	2,46	33,4	3,82	51,9	5,49	74,[illegible]
Periode III. Harnstoff + Kartoffelflocken.													
Grundf. + Harnstoff + Kartoffelflocken	3,76	12,70	477,4	0,71	26,7	11,99	450,7	3,04	114,3	4,05	152,2	4,90	18[illegible]
Grundf. allein	2,94	12,10	355,7	0,69	20,3	11,41	335,4	2,78	81,7	3,77	110,7	4,86	14[illegible]
Aus 0,1047 kg Harnstoff + 0,6015 kg Kartoffelflock.	0,82	14,84	121,7	0,78	6,4	14,06	115,3	3,98	32,6	5,06	41,5	5,02	41[illegible]
Aus 0,1776 kg Harnstoff + 1,02 kg Kartoffelflocken	1,39	14,85	206,4	0,78	10,8	14,07	195,6	3,98	55,3	5,06	70,4	5,03	6[illegible]
In Proz. des Ertrages aus 1 kg Erdnußkuch. %	102,2	121,1		102,9		122,3		165,6		135,6		93,[illegible]	

Tabelle CI.

Wahrscheinliche Erträge an Milch und Milchbestandteilen aus Erdnußkuchen bezw. Harnstoff + Kartoffelflocken von der Kuh Nr. 4. Nach rechnerischer Ausschaltung des Einflusses der Lactation.

Milchertrag aus	Milchmenge	Trock.-Substanz	Asche	Organ. Substanz	Protein	Fett	Milchz. und N-freie organ. Stoffe
	kg	g	g	g	g	g	g
Periode II. Erdnußkuchen.							
Grundfutter + Erdnußkuchen	5,82	703,5	40,5	663,0	148,3	212,7	302,0
Grundfutter allein	4,85	582,5	33,0	549,5	125,1	176,2	248,2
Aus 0,5895 kg Erdnußkuchen	0,97	121,0	7,5	113,5	23,2	36,5	53,8
Aus 1 kg Erdnußkuchen	1,64	205,3	12,7	192,6	39,4	61,9	91,3
Periode III. Harnstoff + Kartoffelflocken.							
Grundfutter + Harnstoff + Kartoffelflocken	6,20	781,8	43,4	738,4	174,6	242,3	321,5
Grundfutter allein	4,85	582,5	33,0	549,5	125,1	176,2	248,2
Aus 0,6015 kg Kartoffelflocken + 0,1047 kg Harnstoff	1,35	199,3	10,4	188,9	49,5	66,1	73,3
A. 1,02 kg Kart.-Flock. + 0,1776 kg Harnst.	2,29	338,1	17,7	320,4	84,0	112,1	124,3
In Proz. d. Ertrag. v. 1 kg Erdnußkuch. %	139,5	164,6	139,4	166,4	213,1	181,1	136,[illegible]

Tabelle CII.
Gewichtsveränderungen der Kuh Nr. 4 während der einzelnen Perioden.

Periode	Dauer Tage	Anfangsgewicht kg	Endgewicht kg	Anzahl der Wägungen	Durchschnittsgewicht aus allen Wägungen kg	Tägliche Gewichtszunahme (+) oder -abnahme (−) kg
I. Grundfutter (Heu + eingesäuerte Zukkerrüben)	8	305,0	307,0	2	306,0	+ **0,25**
II. Grundfutter + Erdnußkuchen	20	307,0	315,0	3	310,7	+ **0,40**
III. Grundfutt. + Harnstoff + Kartoffelflocken	25	315,0	310,0	3	308,3	− **0,20**
IVa. Grundfutter . . .	13	310,0	290,0	7	305,0	− **1,54**

Aus den Kraftfutterzulagen wurden die folgenden Mehrerträge an Milch und Milchbestandteilen gewonnen: Aus 1 kg Erdnußkuchen 1,36 kg Milch und 170,5 g Milchtrockensubstanz. Aus 1,02 kg Kartoffelflocken und 0,1776 kg Harnstoff 1,39 kg Milch und 206,4 g Milchtrockensubstanz. Die Erträge aus dem Erdnußkuchen liegen zwischen den an den Kühen Nr. 2 und 3 beobachteten Werten, dagegen hat die Kombination von Harnstoff und Kartoffeln hier einen etwas höheren Effekt auf die Milchleistung gehabt als die Erdnußkuchen. Es wurden nämlich durch Harnstoff und Kartoffelflocken um 2,2% mehr an Milch und um 21,1% mehr an Milchtrockensubstanz erzielt als durch die gleiche Nährstoffmenge in Form von Erdnußkuchen (Tabelle C). Wenn wir die fallende Tendenz der Milchsekretion rechnerisch ausschalten und also die wahrscheinlichen Milcherträge berechnen, so würden sich die Mehrerträge aus Kartoffelflocken und Harnstoff gegenüber Erdnußkuchen auf 39,5% an Milch und 64,6% an Trockensubstanz erhöhen (Tabelle CI). Was die Gewichtsveränderungen der Kuh Nr. 4 in den einzelnen Perioden betrifft, so waren dieselben in den ersten 3 Perioden gering, sie betrugen nämlich in der Grundfutterperiode I +0,25 kg, in der Erdnußkuchenperiode II +0,40 kg und in der Harnstoff-Kartoffelflockenperiode III —0,20 kg im Durchschnitt pro Tag. In der abschließenden Grundfutterperiode waren dieselben allerdings größer, die Kuh verlor hier täglich 1,54 kg von ihrem Körpergewicht.

Es ist nun von Interesse zu untersuchen, ob die verschiedenen Kraftfutterzulagen spezifische Wirkungen auf den Gehalt der Milch in ihren verschiedenen Bestandteilen geäußert haben. Wir geben in den folgenden 2 Tabellen CIII u. CIV diesbezügliche Übersichten. Die Tabelle CIV enthält die Durchschnittszahlen für sämtliche Perioden aus den Versuchsreihen C und D.

Bezüglich der spezifischen Wirkungen der Kraftfutterzulagen auf die Zusammensetzung der Milch ist folgendes zu schließen. Harnstoffzulagen allein erhöhten den Proteingehalt der Milch um geringe Werte [Versuchsreihe A u. C][1]).

Der prozentische Fettgehalt der Milch blieb durch Harnstoff so gut wie unbeeinflußt. In Kombination mit Zuckerrüben bewirkte der Harnstoff eine kleine Verminderung des prozentischen Proteingehaltes der Milch, dagegen eine geringe

[1]) Bei Versuchsreihe B an der Kuh Nr. 2 unmittelbar vor dem Trockenstehen konnten spezifische Wirkungen nicht beobachtet werden, weil die Milchdrüse auf Kraftfutterzulagen nur noch sehr wenig reagierte, der Trockensubstanzgehalt der Milch nahm kontinuierlich zu, was unmittelbar vor dem Trockenstehen stets der Fall zu sein pflegt.

Tabelle CIII.

Prozentische Zusammensetzung der Milch der einzelnen Kühe in sämtlichen Perioden der Versuchsreihen A—D.

Versuchsreihe	Kuh Nr.	Periode	Milchmenge	Zusammensetzung der Milch					
				Trock.-Substanz	Asche	Organ. Substanz	Protein	Fett	Milchzucker und andere stickstofffreie organische Stoffe
			kg	%	%	%	%	%	%
A	5	I. Proteinärmeres Grundfutter	10,99	10,36	0,69	9,67	2,19	2,53	4,93
A	5	II. Proteinärmeres Grundfutter + Harnstoff	12,19	10,36	0,64	9,72	2,29	2,53	4,90
A	5	III. Proteinärmeres Grundfutter	8,18	9,96	0,63	9,33	2,06	2,26	5,01
A	5	IV. Proteinreicheres Grundfutter	8,46	10,18	0,66	9,52	2,14	2,46	4,92
A	5	V. Proteinreicheres Grundfutter + Harnstoff	9,38	10,50	0,61	9,89	2,39	2,56	4,94
A	5	VI. Proteinreicheres Grundfutter	7,41	10,11	0,63	9,48	2,34	2,23	4,91
B	2	I. Grundfutter (Heu + Zuckerrüben + Erdnußkuchen)	6,83	11,44	0,71	10,73	2,49	3,15	5,09
B	2	II. Grundfutter + Harnstoff	6,78	11,65	0,71	10,94	2,56	3,19	5,19
B	2	III. Grundfutter	5,68	11,85	0,73	11,12	2,95	3,26	4,91
C	3 u. 4	I. Grundfutter (Heu + Zuckerrüben	10,16	11,54	0,69	10,85	2,52	2,96	5,37
C	3 u. 4	II. Grundfutter + Harnstoff	11,16	11,46	0,69	10,77	2,60	2,96	5,21
C	3 u. 4	III. Grundfutter	8,52	11,24	0,70	10,54	2,45	2,79	5,30
C	3 u. 4	IV. Grundfutter + Harnstoff + Zuckerrüben	9,12	11,54	0,68	10,86	2,35	3,09	5,42
C	3 u. 4	V. Grundfutter + Erdnußkuchen	9,52	11,60	0,70	10,90	2,57	3,03	5,30
C	3 u. 4	VI. Grundfutter	7,32	11,11	0,70	10,41	2,43	2,70	5,28
C	1	III. Grundfutter (Heu + Zuckerrüben)	9,10	11,16	0,70	10,46	2,42	3,04	5,00
C	1	IV. Grundfutter + Harnstoff + Zuckerrüben	9,66	11,23	0,73	10,50	2,40	3,04	5,06
C	1	V. Grundfutter + Erdnußkuchen	10,10	11,87	0,74	11,13	2,86	3,52	4,75
C	1	VI. Grundfutter	7,74	11,62	0,73	10,89	2,73	3,36	4,80
D	2	I. Grundfutter (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben)	6,32	11,43	0,72	10,71	2,71	2,90	5,10
D	2	II. Grundfutter + Erdnußkuchen	7,35	11,73	0,73	11,00	2,71	3,16	5,13
D	2	III. Grundfutter + Harnstoff + Kartoffelflock.	6,98	11,66	0,73	10,93	2,80	3,06	5,07
D	2	IV. Grundfutter + Kartoffelflocken	6,07	11,76	0,72	11,04	2,71	3,10	5,23
D	2	V. Grundfutter	6,01	11,74	0,72	11,02	2,80	3,14	5,08

Tabelle CIII (Fortsetzung).

Versuchsreihe	Kuh Nr.	Periode	Milchmenge kg	Trock.-Substanz %	Asche %	Organ. Substanz %	Protein %	Fett %	Milchzucker und andere stickstofffreie organische Stoffe %
D	3	I. Grundfutter (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben)	7,85	10,72	0,70	10,02	2,33	2,34	5,35
	3	II. Grundfutter + Erdnußkuchen	9,13	10,85	0,69	10,16	2,25	2,59	5,32
	3	III. Grundfutter + Harnstoff + Kartoffelflock.	7,48	10,86	0,71	10,15	2,42	2,59	5,14
	3	IV. Grundfutter + Kartoffelflocken	5,05	10,49	0,73	9,76	2,50	2,25	5,01
	3	V. Grundfutter	4,71	10,89	0,71	10,18	2,59	2,55	5,04
	4	I. Grundfutter (Heu + eingesäuerte Zuckerrüben)	4,85	12,01	0,68	11,33	2,58	3,63	5,12
	4	II. Grundfutter + Erdnußkuchen	4,82	12,12	0,70	11,42	2,61	3,70	5,11
	4	III. Grundfutter + Harnstoff + Kartoffelflock.	3,76	12,70	0,71	11,99	3,04	4,05	4,90
	4	IVa. Grundfutter	2,38	12,15	0,70	11,45	2,88	3,85	4,72

Tabelle CIV. Zusammensetzung der Milch in den Perioden der Versuchsreihen C und D im Mittel aller Kühe.

Versuchsreihe	Kuh Nr.	Periode	Milchmenge kg	Trock.-Substanz %	Asche %	Organ. Substanz %	Protein %	Fett %	Milchzucker und andere N-freie organ. Stoffe %
C	3 u. 4	I. Grundfutter (Heu + Zuckerrüben)	10,16	11,54	0,69	10,85	2,52	2,96	5,37
	3 u. 4	II. Grundfutter + Harnstoff	11,16	11,46	0,69	10,77	2,60	2,96	5,21
	1,3 u. 4	III. Grundfutter	8,71	11,21	0,70	10,51	2,44	2,87	5,20
	1,3 u. 4	IV. Grundfutter + Harnstoff + Zuckerrüben	9,30	11,44	0,70	10,74	2,37	3,07	5,30
	1,3 u. 4	V. Grundfutter + Erdnußkuchen	9,71	11,69	0,71	10,98	2,67	3,19	5,12
	1,3 u. 4	VI. Grundfutter	7,46	11,28	0,71	10,57	2,53	2,92	5,12
D	2,3 u. 4	I. Grundfutter (Heu + eingesäuert. Zuckerrüben)	6,34	11,39	0,70	10,69	2,54	2,96	5,19
	2,3 u. 4	II. Grundfutter + Erdnußkuchen	7,10	11,57	0,71	10,86	2,52	3,15	5,19
	2,3 u. 4	III. Grundfutter + Harnstoff + Kartoffelflock.	6,07	11,74	0,72	11,02	2,75	3,23	5,04
	2 u. 3	IV. Grundfutter + Kartoffelflocken	5,56	11,13	0,73	10,40	2,60	2,68	5,12
	2 u. 3 4	V. Grundfutter IVa. Grundfutt. } (Heu + einges. Zuckerrüben)	4,37	11,59	0,71	10,88	2,76	3,18	4,94

Erhöhung des prozentischen Fettgehaltes, die praktisch bedeutungslos sind. Im Gemisch mit Kartoffelflocken hatte der Harnstoff einen kleinen positiven Erfolg in bezug auf den prozentischen Protein- und Fettgehalt. Positive Wirkungen auf den prozentischen Protein- und Fettgehalt der Milch hatten auch die Erdnußkuchen. Dieser Effekt war in der Versuchsreihe C etwas stärker, in der Versuchsreihe D etwas schwächer im Vergleich zu Harnstoff in Kombination mit einem eiweißarmen Futtermittel.

Es erschien uns nun von Interesse, zu untersuchen, ob der Amidgehalt der Milch nach Harnstoffütterung ansteigt oder ob dies nicht der Fall ist. Unter normalen Verhältnissen ist der Gehalt der Milch an Amiden bekanntlich sehr gering; nach *W. Kirchner*[1]) enthält Kuhmilch bei einem durchschnittlichen Gehalt von 3,4% Rohprotein 0,20% Amide bzw. 5,9% des Rohproteins. Wir haben in sämtlichen Perioden der Versuchsreihe D bei den Kühen Nr. 2, 3 und 4 das Verhältnis von Reineiweiß zu Amiden nach *Barnstein* bestimmt, die erhaltenen Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle CV.

Verhältnis von Eiweißstickstoff zu Amidstickstoff in der Milch der Kühe Nr. 2, 3 und 4 in Versuchsreihe D.

Periode	Kuh Nr. 2			Kuh Nr. 3			Kuh Nr. 4		
	Milchmenge	Vom Gesamtstickstoff waren in Prozenten		Milchmenge	Vom Gesamtstickstoff waren in Prozenten		Milchmenge	Vom Gesamtstickstoff waren in Prozenten	
		Eiweißstickst.	Amidstickst.		Eiweißstickst.	Amidstickst.		Eiweißstickst.	Amidstickst.
	kg	%	%	kg	%	%	kg	%	%
I. Grundfutter	6,32	97,24	2,76	7,85	96,27	3,73	4,85	99,71	0.29
II. Grundfutter + Erdnußkuchen	7,35	97,84	2,16	9,13	93,66	6,34	4,82	97.10	2.90
III. Grundfutter + Kartoffelflocken + Harnstoff	6,98	97,12	2,88	7,48	92,84	7,16	3,76	94,23	5.77
IV. Grundfutter + Kartoffelflocken	6,07	98,40	1,60	5,05	96,65	3,35	—	—	—
IV. a Grundfutter	—	—	—	—	—	—	2,38	100,0	—
V. Grundfutter	6,01	95,96	4,04	4,71	95,15	4,85	—	—	—
IV. b Grundfutter + Harnstoff	—	—	—	—	—	—	3,06	94,61	5,39

In Versuchsreihe C, Periode IV (Grundfutter + Harnstoff und Zuckerrüben) waren im Mittel der Kühe 1, 3 und 4 vom Gesamtstickstoff der Milch 95,20% Eiweißstickstoff und 4,80% Amidstickstoff. Diese Zahl bleibt also hinter dem Durchschnitt nach Kirchner erheblich zurück.

Wir ersehen aus der vorstehenden Tabelle, daß der durchschnittliche Amidgehalt der Milch nur in 2 Perioden an der Kuh Nr. 3 etwas überschritten worden ist. An dieser Kuh wurden in der Erdnußkuchenperiode II 6,34% und in der Harnstoff-Kartoffelflockenperiode III 7,16% Amide, bezogen auf das Rohprotein, gefunden. Hiernach kann es sich, sofern Harnstoff überhaupt in die Milch übergeht, nur um sehr kleine Mengen handeln. Ein wenig ist der Amidgehalt bei Harnstoffütterung nach unseren Versuchen allerdings immer erhöht, was aber

[1]) *W. Kirchner*, Handbuch der Milchwirtschaft, Berlin 1907.

praktisch bedeutungslos ist. Im übrigen scheint bis auf wenige Ausnahmen der Amidgehalt relativ zum Eiweiß um so geringer zu sein, je kleiner die sezernierten Milchmengen sind und umgekehrt.

Wir haben uns aber mit der Bestimmung des Gehaltes der Milch an Amidstickstoff nach *Barnstein* nicht begnügt, sondern auch Ammoniak- und Harnstoffbestimmungen ausgeführt. Die betreffenden Untersuchungen wurden mit der Milch der 3 Kühe Nr. 2, 3 und 4 in der Versuchsreihe D vorgenommen. Bekanntlich sind sowohl Ammoniak[1]) als auch Harnstoff in allerdings sehr kleinen Mengen regelmäßige Bestandteile der Milch. Zu den Analysen diente Trockenmilch, die wir in der folgenden Weise hergestellt haben: Die Milch-Durchschnittsprobe von jeder Periode wurde in flache Porzellanschalen gebracht, die auf ein Wasserbad gestellt wurden. In der dünnen Schicht trocknet die Milch ziemlich schnell ein. Die Trockenmilch wurde mit einem Spatel abgeschabt und stellte ein Pulver von fast rein weißer Farbe dar; natürlich mußte bei dieser Methode freies Ammoniak entweichen, so daß die von uns gefundenen Zahlen für den prozentischen Ammoniakgehalt der Milch nur bedingten Wert besitzen können. Die Ammoniakbestimmungen waren im übrigen gar nicht Gegenstand der Untersuchung, sie wurden nur deshalb ausgeführt, weil bei der von uns gewählten Harnstoffbestimmung der Harnstoff in Ammoniak übergeführt werden mußte. Zur Ammoniakbestimmung wurde die Trockenmilch mit Wasser und Magnesiumoxyd gut vermischt und mit Pikrinsäure versetzt, um das starke Schäumen bei der Destillation zu verhindern. Das Destillat wurde in eingestellter Schwefelsäure aufgefangen und der Überschuß an letzterer zurücktitriert. Wir fanden in der Trockenmilch noch folgende Ammoniakmengen, bezogen auf Frischmilch:

Versuchsreihe D Periode:	Prozentischer Ammoniakgehalt der Durchschnittsmilch von		
	Kuh Nr. 2	Kuh Nr. 3	Kuh Nr. 4
II. Erdnußkuchen	0,016%	0,0088	0,0117
III. Harnstoff und Kartoffelflocken	0,007%	0,0099	0,0112
IV a. Grundfutter	—	—	0,0173
IV b. Harnstoff	—	—	0,0109

Was den Harnstoffgehalt der Milch betrifft, so ist derselbe nach älteren Analysen, wie erwähnt, ebenfalls sehr gering; derselbe beträgt nach *Fleischmann* (l. c. S. 48) nur etwa 0,007%. In Molken ermittelte *Lofort*[2]) 0,0167% und *Vogel*[3]) 0,007% Harnstoff.

Zur Bestimmung des Harnstoffs besitzen wir eine sehr genaue Methode in der Aufspaltung des Harnstoffs zu Ammoniak und Kohlensäure auf fermentativem Wege mit sog. Ureasen, die z. B. aus bestimmten Pflanzensamen gewonnen werden. Als besonders wirksam hat sich nach *Armstrong-Horton*[4]) die Urease der Sojabohnen erwiesen, die wir ebenfalls benutzten. Zur Darstellung des ureasehaltigen Extraktes wurde wie folgt verfahren. Die Sojabohnen wurden zunächst fein gemahlen und im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur vollständig getrocknet. Die Trockensubstanz wurde mit Petroläther bzw. wasserfreiem

[1]) *Latschenberger*, Tierchem. Jahresbericht **14**, 222, zit. nach *W. Fleischmann*, Lehrbuch der Milchwirtschaft III. Aufl. 1901.

[2]) Zeitschr. f. Chem. 1866, S. 190.

[3]) Jahresber. üb. d. Fortschr. d. Chemie 1867, S. 932; zit. nach *Beilstein*, Handbuch der org. Chemie III. Aufl., Bd. I, S. 1290.

[4]) Proc. of the roy. soc. of London, Ser. B. **85**, 577 und **86**, Nr. 588.

Äthyläther zur Entfernung des Fettes extrahiert. Hierauf wurde das Sojabohnenmehl mit der 5—6fachen Menge destillierten Wassers gemischt und etwa 24 Stunden lang in den Eisschrank gestellt. Sodann wurde filtriert und zur Harnstoffbestimmung je 5 g Trockenmilch (in ca 100 ccm Wasser) mit 2 ccm des Filtrates versetzt, das Gemisch 2 Stunden lang bei einer Temperatur von 40—50° gehalten und schließlich wie bei den Ammoniakbestimmungen destilliert Die Brauchbarkeit der Methode wurde an Harnstofflösungen mit bekanntem Gehalt geprüft, die Bestimmung erwies sich als sehr genau. Versuche mit anderen Amiden, z. B. Asparagin, waren, wie im Hinblick auf die strenge Spezifizität der Ureasewirkung nicht anders zu erwarten war, absolut negativ. Die Harnstoffbestimmungen in der Milch der 3 Kühe in Versuchsreihe D hatten folgendes Ergebnis:

Versuchsreihe D Periode:	Harnstoffgehalt der Durchschnittsmilch von		
	Kuh Nr. 2	Kuh Nr. 3	Kuh Nr. 4
II Erdnußkuchen	0,00976%	0,0245%	0,0192%
III Harnstoff und Kartoffelflocken	0,0109%	0,0138%	0,0477%
IV a Grundfutter	—	—	0,0023%
IV b Harnstoff		—	0,0319%

Wenn wir die vorstehenden Zahlen über den Harnstoffgehalt der Milch unter verschiedenen Ernährungsbedingungen mit den älteren diesbezüglichen Befunden vergleichen, so sind größere Unterschiede nicht festzustellen, wir fanden z. T. höhere, z. T. niedrigere Werte. Die Ergebnisse über den Harnstoffgehalt der Milch nach Harnstoffzufuhr und ohne dieselbe sind bei den 3 Kühen nicht absolut gleichsinnig ausgefallen. Bei der Kuh Nr. 2 war der Harnstoffgehalt der Milch in der Erdnußkuchenperiode II und in der Harnstoff-Kartoffelflockenperiode III nahezu übereinstimmend 0,01%. Bei der Kuh Nr. 3 wurde in der Milch der Erdnußkuchenperiode II 0,024 und in der Harnstoffperiode III 0,014% Harnstoff ermittelt. Die Milch enthielt also während der Erdnußkuchenperiode fast doppelt soviel Harnstoff als in der Harnstoffperiode. Die Wiederholung der

Tabelle CVI.

In den Versuchsreihen A—C unter verschiedenen Bedingungen durch 1 kg Harnstoff erzielte Erträge an Milch und an Milchbestandteilen.

Versuchsreihe	Kuh Nr.	Periode	Futterverzehr	Milchmenge kg	Trock.-Substanz g	Asche g	Organ. Substanz g	Protein g	Fett g	Milchzucker und andere N-freie organische Stoffe g
A	5	II	Harnstoff als Zulage zu *proteinärmerem* Grundfutter	16.73	1834,0	88,7	1745,3	480,0	492,7	772,6
A	5	V	Harnstoff als Zulage zu *proteinreicherem* Grundfutter	9.53	1188,7	38,0	1150,7	312,7	352,0	486,0
B	2	II	Harnstoff als Zulage zu Heu, Zuckerrüben und Erdnußkuchen	2,75	323,5	16,5	307,0	24.0	84,0	199,0
C	3 u. 4	II	Harnstoff als Zulage zu Heu und Zuckerrüben	12.13	1421.4	80,7	1340,7	386,0	408,0	546,7

Tabelle CVII.

In den Versuchsreihen C und D unter verschiedenen Bedingungen erzielte Erträge an Milch und Milchbestandteilen aus *1 kg Erdnußkuchen* bezw. ***Harnstoff-Zuckerrüben-*** oder ***Harnstoff-Kartoffelflocken-Gemischen*** mit dem gleichen Gehalt an verdaulichem Rohprotein und Stärkewert.

Versuchsreihe	Kuh Nr.	Periode	Milchertrag aus	Milchmenge kg	Trockensubstanz g	Asche g	Organische Substanz g	Protein g	Fett g	Milchzucker und andere N-freie, organ. Stoffe g
C	1	V	1 kg Erdnußkuchen	2,25	304,1	18,4	285,7	85,6	103,8	96,3
C	1	IV	171,0 g Harnstoff + 4,34 kg Zuckerrüben	1,22	128,6	10,8	117,8	17,0	26,1	74,7
C			Harnstoffeffekt in Prozenten des Ertrages von 1 kg Erdnußkuchen . . . . %/o	54,2	42,3	59,7	41,2	19,9	25,1	77,6
C	3 u. 4	V	1 kg Erdnußkuchen	2,08	278,9	14,5	264,4	64,9	88,1	111,4
C	3 u. 4	IV	171 g Harnstoff + 4,34 kg Zuckerrüben	1,17	166,2	6,0	160,2	18,8	66,4	75,0
C			Harnstoffeffekt in Prozenten des Ertrages von 1 kg Erdnußkuchen . . . . %/o	56,3	59,3	41,4	60,6	29,0	75,4	67,3
D	2	II	1 kg Erdnußkuchen	1,10	148,3	9,2	139,1	29,4	46,6	63,1
D	2	III	177,6 g Harnstoff + 1,02 kg Kartoffelflock.	0,83	99,6	6,4	93,2	25,6	27,8	39,8
D			Harnstoffeffekt in Prozenten des Ertrages von 1 kg Erdnußkuchen . . . . %/o	75,5	67,2	69,6	67,0	87,1	59,7	63,1
D	3	II	1 kg Erdnußkuchen	2,43	276,5	15,7	260,8	44,5	84,2	132,1
D	3	III	177,6 g Harnstoff + 1,02 kg Kartoffelflock.	1,68	189,0	12,4	176,6	39,6	56,9	80,1
D			Harnstoffeffekt in Prozenten des Ertrages von 1 kg Erdnußkuchen . . . . %/o	69,1	68,4	79,0	67,8	89,0	67,6	60,7
D	4	II	1 kg Erdnußkuchen	1,36	170,5	10,5	160,0	33,4	51,9	74,7
D	4	III	177,6 g Harnstoff + 1,02 kg Kartoffelflock.	1,39	206,4	10,8	195,6	55,3	70,4	69,9
D			Harnstoffeffekt in Prozenten des Ertrages von 1 kg Erdnußkuchen . . . . %/o	102,2	121,1	102,9	122,3	165,6	135,6	93,6

Analysen führte zu demselben Ergebnis, so daß dieser Befund feststeht. Bei der Kuh Nr. 4 wurden

in der Erdnußkuchenperiode II . . . . 0,019% Harnstoff
„ „ Harnstoff-Kartoffelflockenperiode III . . . 0,048% „
„ „ Grundfutterperiode IVa . . . . 0,002% „
„ „ Harnstoffperiode IVb . . . . 0,032% „

gefunden. In der Grundfutterperiode IVa beobachteten wir den überhaupt niedrigsten Harnstoffgehalt mit 0,002%, in der Erdnußkuchenperiode II war derselbe mit rund 0,02% nahezu 10 mal so hoch; die Proteinzulage (Erdnußkuchen) hat hiernach den Harnstoffgehalt der Milch erhöht; in der Harnstoffperiode IVb war der Harnstoffgehalt etwa um die Hälfte höher, in der Harnstoff-Kartoffelflockenperiode III mehr als doppelt so hoch wie in der Erdnußkuchenperiode II. Immerhin ist der absolute Harnstoffgehalt der Milch, auch wenn wir die Periode III an der Kuh Nr. 4 mit dem beobachteten Höchstgehalt heranziehen, noch sehr gering. Die Tagesmilch enthielt hier 1,792 g Harnstoff, die Harnstoffzufuhr betrug 104,7 g, demnach betrug der Harnstoffgehalt der Milch 1,7% der verzehrten Menge. Wir dürfen aber keinesfalls diese gesamte Harnstoffmenge dem verfütterten Harnstoff zur Last rechnen, da ja die Milch auch bei harnstoffreier Fütterung stets Harnstoff enthält.

Wenn wir die sämtlichen Untersuchungsergebnisse an den 3 Kühen zusammenfassen, so kann nur gefolgert werden, daß durch die Verfütterung von Harnstoff der Gehalt der Milch hieran kaum erhöht zu werden vermag und daß derselbe überhaupt stets sehr gering ist; er betrug im Höchstfalle 0,048%.

Eine Übersicht über die durch die Kraftfutterzulagen erzielten Erträge an Milch und Milchbestandteilen enthalten die 2 Tabellen CVI u. CVII. Außerdem werden in der Tabelle CVIII die Durchschnittswerte für die Versuchsreihen C und D mitgeteilt.

Tabelle CVIII.

Mittlere Erträge aus Harnstoff und Eiweißarmen Futtermitteln (Rüben bezw. Kartoffeln) im Vergleich zu Erdnußkuchen.

Versuchsreihe	Im Mittel der Kühe Nr.	Anzahl der gemittelten Vers.	Periode Nr.	Milchertrag aus	Milchmenge kg	Trock.-Substanz g	Asche g	Organ. Substanz g	Protein (N · 6,25) g	Fett g	Milchzucker und andere N-freie Stoffe g
C	1, 3 u. 4	3	V	1 kg Erdnußkuchen	2,14	287,3	15,8	271,5	71,8	93,3	106,4
			IV	171,0 g Harnstoff + 4,34 kg Zuckerrüben	1,19	153,7	7,6	146,1	18,2	53,0	74,9
In Prozenten des Ertrages aus 1 kg Erdnußkuchen . . . . %					55,6	53,5	48,1	53,8	25,4	56,8	70,4
D	2, 3 u. 4	3	II	1 kg Erdnußkuchen	1,63	198,4	11,8	186,6	35,8	60,9	89,9
			III	177,6 g Harnstoff + 1,02 kg Kartoffelflocken	1,30	165,0	9,9	155,1	40,1	51,7	63,3
In Prozenten des Ertrages aus 1 kg Erdnußkuchen . . . . %					79,7	83,2	84,0	83,1	112,0	84,9	70,4

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Vorstehend wurde über 40 Einzelversuche an 5 Kühen berichtet, welche die Verwertung des Harnstoffs allein und im Gemisch mit eiweißarmen Futtermitteln (Kartoffeln bzw. Zuckerrüben) im Vergleich zu Erdnußkuchen zum Gegenstande hatten. Der minimale Erhaltungsbedarf an verdaulichem Rohprotein betrug unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen 0,33 kg pro 1000 kg Lebendgewicht und Tag. Insgesamt gelangten 11 Harnstoffperioden zur Durchführung. Die Erträge an Milch und an Milchbestandteilen wurden durch Harnstoffzufuhr ausnahmslos erhöht. *Harnstoff allein* wurde als Zulage zum Grundfutter in 5 Perioden an 4 Milchkühe verabreicht. Wenn wir von einem Versuch absehen, der an einer hochtragenden Kuh unmittelbar vor dem Trockenstehen durchgeführt wurde, und bei dem die Milchdrüse auf Kraftfutterzulagen eben nur noch sehr wenig reagierte, steigerten Harnstoffgaben die Milchsekretion stark. Natürlich waren die Milcherträge je nach der Individualität der Kühe, dem Lactationsstadium, dem größeren oder geringeren Proteingehalt des Futters usw. verschieden. Aus 1 kg Harnstoff wurden in 4 Versuchen an 3 Kühen zwischen 9,53 und 16,73 kg Milch, sowie zwischen 1188,7 und 1834,0 g Milchtrockensubstanz, im Durchschnitt *12,63 kg Milch* und *1466,4 g Milchtrockensubstanz* gewonnen. Es sind dies die direkt erhaltenen Milcherträge; wenn wir den Einfluß des Lactationsstadiums rechnerisch ausschalten, würden sich noch wesentlich höhere Werte ergeben (siehe die diesbezüglichen Ergebnisse bei den betreffenden Versuchen). *Harnstoff in Kombination mit einem eiweißarmen Futtermittel* wurde in 6 Perioden an 4 Kühe verfüttert und zwar im Gemisch mit Zuckerrüben in 3 Perioden an 3 Kühe, zusammen mit Kartoffelflocken ebenfalls in 3 Perioden an 3 Kühe. In 3 Vergleichsperioden erhielten 3 Kühe dieselben Zulagen an verdaulichem Rohprotein und Stärkewert in Form von Erdnußkuchen (also insgesamt 9 Einzelversuche).

In den Versuchen mit Erdnußkuchen im Vergleich zu *Harnstoff und Zuckerrüben* wurde folgendes gefunden: Die aus 1 kg Erdnußkuchen erzielten Erträge waren im Durchschnitt 2,14 kg Milch und 287,3 g Milchtrockensubstanz. Aus der gleichen Nährstoffmenge in Form von 171 g Harnstoff und 4,34 kg Zuckerrüben wurden erhalten 1,19 kg Milch und 153,7 g Milchtrockensubstanz, das sind 55,6% der Milchmenge und 53,5% der Erträge an Milchtrockensubstanz aus Erdnußkuchen. Die Versuche mit Erdnußkuchenzulagen im Vergleich zu der Kombination *Harnstoff und Kartoffelflocken* in Versuchsreihe D ergaben folgendes: Aus 1 kg Erdnußkuchen wurden erzielt 1,63 kg Milch und 189,4 g Milchtrockensubstanz. Aus 177,6 g Harnstoff und 1,02 kg Kartoffelflocken dagegen 1,30 kg Milch und 165,0 g Milchtrockensubstanz, das sind rund $^4/_5$ der Milch- und Milchtrockensubstanzmenge,

die aus den Erdnußkuchen erhalten wurden. Die Milcherträge aus den Erdnußkuchen waren somit in der Versuchsreihe D im Vergleich zu C infolge des vorgeschrittenen Lactationsstadiums der Kühe zurückgegangen[1]). Von dieser fallenden Tendenz bezüglich der Milchleistung wurden scheinbar die Perioden mit Harnstoff und Kartoffelflocken nicht betroffen. Die Milcherträge waren vielmehr in diesen Perioden noch etwas höher als in den früheren mit der Kombination Harnstoff und Zuckerrüben. Die höhere Verwertung des Harnstoffs mit Kartoffelflocken im Vergleich zu Zuckerrüben ist, wie oben (siehe S. 414) näher ausgeführt, im wesentlichen auf die ungünstigere Stellung der Harnstoff-Zuckerrübenperiode in der Versuchsreihe C zurückzuführen. Die abgesehen von dem Protein[2]) durch Kartoffelflocken und Harnstoff im Vergleich zu Erdnußkuchen um rund 20% geringeren Erträge dürften in der Hauptsache durch die leichte Löslichkeit des Harnstoffs bedingt sein. Vermutlich trat ein Bruchteil der Harnstofflösung, ohne zu Bakterieneiweiß synthetisiert zu werden, in den Darm; der resorbierte Harnstoff ist natürlich für die Ernährung wertlos. Hieraus ergibt sich, um eine höchstmögliche Ausnutzung des Carbamids zu gewährleisten, die Notwendigkeit, den Harnstoff möglichst gut mit dem gesamten übrigen Futter zu vermischen, was wir nur bei der Versuchsreihe A an der Kuh Nr. 5 durchgeführt haben[3]).

Spezifische Wirkungen der Kraftfutterzulagen auf den Gehalt der Milch an Einzelbestandteilen äußerten sich insofern, als sowohl einerseits Erdnußkuchen allein als auch andererseits Harnstoff in Kombination mit eiweißarmen Futtermitteln positive Wirkungen auf den Protein- und Fettgehalt der Milch hatten. Die spezifischen Wirkungen auf den Fettgehalt der Milch waren so gering, daß sie praktisch keine Rolle spielen dürften. In den Harnstoffperioden stieg der Amidgehalt der Milch ein wenig an, aber um so geringe Werte, daß diesen Befunden keine Bedeutung zukommt (siehe S. 424). Zu demselben Schluß führten die genauen Harnstoffbestimmungen in der Milch von 3 Kühen.

Unsere Harnstoffversuche an Milchkühen erweisen in Übereinstimmung mit früheren an Lämmern über die Verwertung des Harnstoffes für die Fleischbildung (l. c.), daß dieses Amid, wie auch andere Amide, geeignet ist, die Rolle des Nahrungseiweißes bei der Milchsekretion von Wiederkäuern in einem gewissen Umfange zu übernehmen. Dasselbe

---

1) In der Versuchsreihe C wurden aus 1 kg Erdnußkuchen 2,14 kg Milch, und 287,3 g Milchtrockensubstanz, in der Versuchsreihe D dagegen nur 1,63 kg Milch und 198,4 g Milchtrockensubstanz erzielt.

2) An Milcheiweiß wurde aus Harnstoff und Kartoffelflocken 12% mehr gewonnen als aus Erdnußkuchen.

3) Hier wurde der Harnstoff mit dem übrigen Futter gut vermischt, während derselbe später in Substanz auf das Futter gestreut und nur oberflächlich untermischt wurde.

ist aus den Bilanzversuchen an der Kuh Nr. 4 zu schließen. Die Freßlust wurde durch Harnstoffgaben gesteigert.

In allen Rationen für Wiederkäuer, die eiweißarm sind, wird man mit Harnstoffzulagen gute Erfolge haben. Wir erinnern daran, daß auch heute noch vielfach Rinder und Schafe während der Winterstallfütterung in der Hauptsache nur Hackfrüchte und Rauhfutter erhalten. Auch wenn außerdem noch geringe Mengen an proteinreichem Kraftfutter zur Verfügung stehen, werden Harnstoffgaben, wie aus dem zweiten Teil der Versuchsreihe A, in dem 1 kg Malzkeime pro Kopf und Tag verfüttert wurde, ersichtlich noch gut verwertet. Es ist hierbei von besonderer volkswirtschaftlicher Bedeutung, daß der Harnstoff im Inlande aus dem Luftstickstoff synthetisiert wird, und daß in dem Umfange seiner Verwendung als stickstoffhaltiger Nährstoff in Rationen für Herbivoren die großen Summen für importierte proteinreiche Kraftfuttermittel eingeschränkt werden können. Um eine höchstmögliche Verwertung des Harnstoffes zu erzielen, ist es zweckmäßig, denselben außer der eben erwähnten guten Durchmischung mit dem übrigen Futter in nicht zu großen Gaben zu verabreichen. Im allgemeinen sollte eine tägliche Gabe von 150 g Harnstoff (entsprechend 375 g verdaulichem Rohprotein) pro Kuh nicht überschritten werden[1]).

Die Benutzung der sogenannten mittleren Verdauungswerte zur Berechnung des Gehaltes der Rationen an resorbierbaren Nährstoffen kann zu falschen Vorstellungen über die von den Versuchstieren wirklich verdauten Nährstoffmengen führen. Wir fanden bei den vorstehend mitgeteilten Versuchen die größten Unstimmigkeiten zwischen Rechnung und Tierversuch beim verdaulichen Rohprotein. Die Unterschiede betrugen bis annähernd 100%. Es ergibt sich hieraus die Notwendigkeit der Ausführung von Stoffwechselversuchen in jedem Fall, in dem es auf genauere Feststellungen ankommt[2]).

---

[1]) 100 g Harnstoff entsprechen ungefähr 250 g verdaulichem Rohprotein.

[2]) Während bezw. nach der Drucklegung dieser Arbeit sind zwei Veröffentlichungen über denselben Gegenstand erschienen, aus denen sich die Vertretbarkeit des Nahrungseiweißes durch Harnstoff in einem gewissen Umfange ebenfalls ergeben hat. Siehe dazu unter *Morgen* „Die landw. Versuchsstationen" Bd. **29**, S. 1 und *J. Hansen*, Landw. Jahrbücher, Bd. **57**, S. 141. 1922.

Über eine neue kombinierte Fraktionierungsmethode der Proteine und deren Derivate.

Von

M. A. Rakusin.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium des staatlichen wissenschaftlich-technischen Instituts zu Petersburg.)

(Eingegangen am 8. Februar 1922.)

I. Einleitung.

Die komplizierte Molekel der natürlichen Proteine erscheinen in den sog. Albumosen und Peptonen so weit aufgelockert, daß die Idee der Fortsetzung dieser durch die entsprechenden Fermente eingeleiteten Fraktionierung nahelag. So kommt es auch, daß eine Reihe hervorragender Forscher eben die Albumosen und Peptone zu fraktionieren versuchten. Bereits 1902 wies *Hofmeister*[1]) daraufhin, daß die ungleiche Aussalzbarkeit der verschiedenen Albumosen auf einer differenten chemischen Zusammensetzung beruht, indem dieselben verschiedene Löslichkeit in Alkohol und verschiedene Farbenreaktionen (hierunter auch Schwefelbleireaktion) aufweisen. Ferner gelang es *Pick* und *Zunz*[2]) 1897 das sog. Amphopepton *Kühnes* in Pepton A und Pepton B zu zerlegen, von denen nur letzteres in 96 proz. Alkohol löslich ist, und beide Fraktionen wiederum auch verschiedene Farbenreaktionen aufweisen. 1898, also fast gleichzeitig mit *Pick* und *Zunz*, erhielten *Fraenkel* und *Langstein*[3]) aus Pepsinpeptonen 3—4 Fraktionen, die sich ebenfalls durch ihre Löslichkeit in Alkohol, Schwefelgehalt und Verhalten gegen manche Farbenreaktionen unterscheiden. — Zuletzt sei bemerkt, daß auch *Effront* 1899[4]) das Verhalten der Proteosen und Peptone gegen Alkohol studierte, während *Schroetter* 1893[5]) sogar eine in Methylalkohol lösliche Albumose beschrieb.

So sehen wir nun, wie man zur Fraktionierung der Proteine über deren *Verdauungsprodukte* als *Übergangsbrücke* kommen wollte und

---

[1]) *F. Hofmeister*, Über d. Bau u. Gruppier. d. Eiweißkörp. Asher-Spiro, Erg. d. Physiol. **1**, 759. 1902.

[2]) *C. Oppenheimer*, Handb. d. Bioch. d. Tiere u. d. Menschen, **1**, 461. 1909.

[3]) Ebenda.

[4]) *J. Effront*, Chem. Zentralbl. 1899. II, 441.

[5]) *Oppenheimer*, l. c. 453.

wie diese glückliche Idee in den Köpfen verschiedener Forscher allmählich heranreifte. In konsequenter Weise entschlossen wir uns, Fraktionierungsversuche auch an den natürlichen *Proteinen* und *Fermenten*, als deren Bruchstücken, vorzunehmen, denn sowohl erstere als letztere enthalten, wie schon die Farbenreaktionen uns lehren, neben Polypeptiden auch Kohlenhydrate, die auch verschiedenes Verhalten gegen *Lösungsmittel* aufweisen müssen. Bei den geplanten, näher zu beschreibenden Fraktionierungsversuchen gingen wir aber ferner auch von dem Gedanken *Abderhaldens*[1]) aus, daß die Isolierung der einzelnen Proteine nach der Methode des *Aussalzens* nicht exakt ist, da sie oft auch nach wiederholter Dialyse zu Produkten führt, die nicht aschenfrei sind. Auf die durch Alkohol oder andere Lösungsmittel erhaltene *Extrakte* lassen wir nun *Aluminiumhydroxyd* einwirken, da einer von uns nachwies[2]), daß letzteres nur auf Casein adsorbierend wirkt; in den meisten übrigen Fällen tritt *gelinde Hydrolyse* des Proteins ein, wobei die eine oder andere Komponente abgespalten wird; so z. B. wird vom Chondrin quantitativ Chondroitinschwefelsäure abgespalten usw.

Somit zerfällt der von uns hier zu behandelnde Stoff in folgende Abschnitte:

1. Qualitative Prüfung der Proteine und Fermente auf ihr Verhalten gegen Lösungsmittel. (Zunächst Alkohol.)
2. Quantitative Prüfung auf dieselbe Eigenschaft.
3. Qualitative Prüfung der Peptone auf dieselbe Eigenschaft.
4. Quantitative Prüfung der Peptone auf dieselbe Eigenschaft und
5. kombinierte Fraktionierung der Proteinstoffe nach den Methoden der Extraktion und Adsorption. (Konkrete Beispiele.)

II. Verhalten der trockenen natürlichen Proteine und Fermente gegen 95 proz. Alkohol.

A. Qualitative Prüfung.

Wie gesagt, gingen wir bei diesen Versuchen von dem Gedanken *Abderhaldens* aus, daß man die einzelnen Proteinstoffe in chemisch individualisierbarer Form nur durch Behandlung der betreffenden Ausgangsmaterialien mit einem *flüchtigen Lösungsmittel* darstellen kann. Die Versuche wurden wie folgt ausgeführt: Eine kleine Probe der zu untersuchenden Substanz wurde im *Erlenmeyer*schen Kölbchen mit der 10fachen Menge 95 proz. Alkohols übergossen, und alsdann im Laufe von 2 Stunden am Rückflußkühler erwärmt. Das meistgefärbte Extrakt wurde auf einen Faltenfilter gegossen und zunächst auf Farbenreaktionen geprüft, wobei folgende Resultate erhalten wurden:

[1]) Lehrbuch d. physiol. Chemie I.
[2]) Im Druck.

Farbenreaktionen der alkoholischen Auszüge der trockenen Proteine und deren Derivate.

Nr.	Tier-Proteine	Farbenreaktionen d. Auszüge	Anmerkungen
1	Eialbumin . .	*Molisch* und *Ostromyslenski.*	
2	Gelatine . . .	*Molisch* und *Ostromyslenski.*	
3	Hautpulver . .	*Molisch* und *Ostromyslenski.*	
4	Chondrin . . .	*Molisch* und *Pettenkofer.*	
5	Blutfibrin . .	*Molisch* und *Pettenkofer.*	
6	Elastin	*Molisch* und *Ostromyslenski.*	
7	Nucleinsäure .	*Molisch* und *Ostromyslenski.*	
8	NH_4-Albuminat	*Molisch* und *Ostromyslenski.*	Selbst bereitet.
9	Casein	Nur die Reaktion von *Molisch.*	
10	Na-Caseinat . .	Nur die Reaktion von *Molisch.*	Nutrose von Meister, Lucius u. Brüning in Höchst a. M.
11	Keratin . . .	Gibt keine Farbenreaktionen.	Ovokeratin (Huhn).
	Pflanzenproteine		
12	Legumin . . .	Nur die Reaktion von *Molisch.*	
13	Konglutin . .	*Molisch, Pettenkofer, Ostromyslenski*	Aus lupinus luteus.
14	Na-Leguminat.	Nur die Reaktion von *Molisch.*	Selbst bereitet.
	Fermente		
15	Pepsin	*Molisch* und *Ostomyslenski.*	Letztere Reaktion schwach.
16	Papain	*Molisch* und *Ostromyslenski.*	
17	Diastase . . .	*Molisch* und *Ostromyslenski.*	
18	Trypsin. . . .	*Molisch* und *Ostromyslenski.*	
19	Pankreatin . .	*Molisch* und *Ostromyslenski.*	
20	Hefe	Nur von *Ostromyslenski.*	

Die obigen Resultate führen zu folgenden lehrreichen Schlüssen: 1. Alkohol (95 proz.) entzieht Proteinen mit *Ausnahme des Keratins* sowohl stickstoffhaltige Substanzen (Reaktion von *Ostromyslenski*), deren Charakter noch zu erforschen ist, als Kohlenhydrate (Reaktion von *Molisch*). 2. Dem Fibrin und den *Nucleoalbuminen* des Tier- und Pflanzenreichs (Casein und Legumin) werden nur Kohlenhydrate entzogen. 3. Die Proteinate des Ammoniums und der Alkalimetalle verhalten sich dem Alkohol gegenüber wie die entsprechenden Proteine. 4. Das *Keratin* gibt dem Alkohol keine löslichen Stoffe ab. 5. Die obenerwähnten *Fermente* verhalten sich dem Alkohol gegenüber wie vollwertige Proteine; nur die *Hefe* gibt ein von Kohlenhydraten freies Extrakt.

Die nähere Untersuchung der *Extrakte* führt wiederum zu interessanten Resultaten: Behandelt man sie nämlich mit Tierkohle oder noch besser mit $Al(OH)_3$, so werden die mit Pikraminsäure (Reagens von *Ostromyslenski*) reagierenden amphoteren Aminokörper adsorbiert resp. chemisch gebunden, während im Filtrat lediglich krystalline Kohlenhydrate verbleiben, die mit kolloiden Proteinstoffen offenbar in Form einer festen Lösung vorhanden waren und sich deshalb der *mikroskopischen* Beobachtung entzogen. Aus der Aluminiumverbindung

werden sich diese eigentümlichen Aminokörper, die vielleicht auch mit den Vitaminen im Zusammenhang stehen, regenerieren lassen.

Was speziell die alkohollöslichen Kohlenhydrate anbetrifft, so ist es charakteristisch, daß die entsprechenden Auszüge der Diastase und des Papains *Aldosen* enthalten, und deshalb die *Fehling*sche Lösung reduzieren.

B. Quantitative Prüfung.

Die Notwendigkeit einer solchen Prüfung liegt auf der Hand, und wird dieselbe mittels des Extraktionsapparates von *Soxhlet* ausgeführt, welche Operation allerdings ziemlich zeitraubend zu sein scheint. Vorläufig haben wir folgende Extraktionen quantitativ durchgeführt:

Nr.	Substanz	% im Extrakt	Anmerkungen:
1	Eialbumin . .	6,32	3 Arbeitstage extrahiert. 18 Std.
2	Gelatine . . .	1,46	
3	Blutfibrin . .	2,52	
4	Pepsin	87,46	Die Arbeit über Pepsin und Papain führen
5	Papain	69,06	*M. Rakusin* und *S. Iwanow* aus.
6	Hefe	2,30	

Wenn man beachtet, daß die *Fällung der Fermente durch Alkohol* als Grundregel der Enzymologie gilt, so wird man über die vorgeführten Extraktionsresultate staunen; es ist also klar, daß Alkohol auch bei Zimmertemperatur die Fermente beeinflußt, also beim Waschen mit Alkohol usw. In wie hohem Grade speziell Pepsin und Papain inhomogen sind, bedarf wohl kaum der Erläuterung. Beachtet man aber ferner, daß an manchem Protein Molekulargewichtsbestimmungen vorgenommen wurden, so kommt man zur Überzeugung, daß die Revision der betreffenden Arbeiten von Nutzen sein könnte.

III. Verhalten der Peptone gegen 95% Alkohol.

Von den Peptonen haben wir *vorläufig* nur Pepsin-Fibrinpepton qualitativ und quantitativ untersucht, und kamen zu folgenden überraschenden Resultaten. Während das erwähnte Pepton, wie aus unseren früheren Beobachtungen hervorgeht, die 8 Farbenreaktionen gibt (s. u.), gibt der, wie oben angegeben, gewonnene alkoholische Auszug des Peptons nur folgende 6 Farbenreaktionen: Die Biuretreaktion, die von *Millon, Adamkewitsch, Ostromyslenski, Molisch* und *Pettenkofer,* während im *Extraktionsrückstand* ein Körper zurückbleibt, der nur die Reaktion von *Liebermann* und selbstverständlich auch die Xanthoproteinreaktion aufweist.

Schon diese bloß *qualitativ* gewonnenen Resultate sind überaus lehrreich: Man sieht ohne weiteres, in wie hohem Grade das Fibrinmolekel durch den Prozeß der peptischen Verdauung *aufgelockert* wurde, daß der Alkohol den Biuretkomplex, das Tyrosin usw. leicht in Lösung

Schema der sukzessiven Behandlung des alkoholischen Peptonauszuges mit Aluminiumhydroxyd.

Pepsin-Fibrinpepton (Trocken) + 95% Alkohol.

- 39,31% unlöslichen Rückstands, der nur die Reaktion von *Liebermann* u. die Xantoproteinreaktion gibt + 10% $Al(OH)_3$*) – 24 Std.
  - Im Niederschlag eine Substanz, die als Tryptophan betrachtet wird (Xantoproteinreaktion) und die von *Liebermann* 97,69%.
  - Das Filtrat gibt keine einzige Proteinreaktion: enthält nur 2,31% Asche.
- 60,69% Extrakt (I) gibt Reaktionen: Biuretreaktion, *Millons*, von *Adamkewitsch, Molisch, Pettenkofer* und *Ostromyslenski* + 10% $Al(OH)_3$**) – 24 Stunden.
  - Im Niederschlag Tyrosin (Reaktion von *Millon*) 26,87%.
  - Filtrat (II) gibt die Reaktionen des Extraktes (I) *mit Ausnahme der von Millon* + 10% $Al(OH)_3$ – 24 Stunden.
    - Im Niederschlag der Biuretkomplex. (Die Struktur wird z. Zt. erforscht) 15,79%.
    - Filtrat (III) gibt die Reaktionen des Extraktes (II) *mit Ausnahme der Biuretreaktion* + 10% $Al(OH)_3$ – 24 Stunden.
      - Im Niederschlag Aminosäuren mit freien NH_2-Gruppen (Reaktion von *Ostromyslensky*) 19,60%.
      - Filtrat (IV) gibt die Reaktionen von (III) *mit Ausnahme der von Ostromyslenski* + 10% $Al(OH)_3$ – 24 Stunden.
        - Im Niederschlag Tryptophan (Reaktion v. *Adamkewitsch*) 29,01%.
        - Filtrat (V) enthält nur Kohlenhydrate (Reaktionen von *Molisch* und *Pettenkofer*) und Spuren von Tryptophan (Reaktionen von *Adamkewitsch*) + 10% $Al(OH)_3$ – 24 Stunden. Es findet keine Adsorption statt, da die krystallinischen Kohlenhydrate nicht adsorbtionsfähig sind. 8,73%***).

100%.

*) In wässeriger Lösung.
**) In alkoholischer Lösung.
***) 9,17% aus c'''' berechnet.

bringt. Ja, weitere Untersuchungen werden vielleicht zeigen, daß dieses Verhalten der Peptone gegen Alkohol eine allgemeine Eigenschaft der Peptone ist, im Gegensatz zu den entsprechenden nativen Proteinen, deren alkoholische Auszüge, wie wir sahen, nur 2 Farbenreaktionen aufweisen.

Des weiteren sehen wir, daß im Extraktionsrückstand ein Körper vorliegt, der von den 2 „Tryptophanreaktionen" nur die eine von *Liebermann* aufweist, während im Extrakt dagegen ein durch die Reaktion von *Adamkewitsch* charakterisierbarer Körper vorhanden ist. Es ist uns somit die Möglichkeit geboten, zu ergründen, welcher Atomgruppierung jede der 2 genannten Reaktionen entspricht.

Bei der *quantitativen* Durchführung der Extraktion (s. u.) stellte es sich heraus, daß 60,69% *des Pepsin-Fibrinpeptons in Lösung gingen.* Auch dieses ist insofern bemerkenswert, daß das Pepton vorschriftsmäßig *durch Fällung mit Alkohol,* Waschen mit demselben usw. dargestellt wird. Auch ist es klar, daß wir den Gang des Verdauungsprozesses im Laboratorium mittels Alkoholproben verfolgen können, denn wie wir bereits sahen, entzieht Alkohol dem nichthydrolysierten Blutfibrin nur 2,52%.

IV. Kombinierte Fraktionierung des Pepsin-Fibrinpeptons mittels Alkoholextraktion und Behandlung mit Aluminiumhydroxyd.

A. Extraktion des Peptons mittels Alkohol.

Wider jede Erwartung ist diese in der Regel so einfache Operation mit nicht ganz erklärlichen Schwierigkeiten verbunden. Führt man nämlich die Extraktion in der *Soxhlet*schen Vorrichtung aus, und zwar unter Anwendung einer Hülse aus Glas, so merkt man, daß die ursprünglich weiße Peptonmasse, von der man 5—10 g in Arbeit nimmt, recht bald in eine hellbraune Paste übergeht, die die Löchlein im Boden der Hülse verstopft, so daß die Heberwirkung des Apparates aufhört. Da es uns auf keine Weise gelang diesem Übelstande vorzubeugen, so sahen wir uns genötigt, diesesmal die Extraktion derart auszuführen, daß wir die abgewogene Peptonmenge in einem mit Rückflußkühler verbundenen *Erlenmeyer*schen Kolben mit Alkohol übergossen und dann erwärmten, wonach wir jede 2—3 Stunden das gelb gefärbte Extrakt vom braunen, schmierigen Rückstand abgossen. Diese Operation wiederholten wir solange, bis die Auszüge farblos erschienen, was wir als Ende der Extraktion betrachteten. Diese, allerdings etwas umständliche, aber nicht zu umgehende Arbeit nimmt 4—5 Tage in Anspruch.

B. Die methodische Behandlung des Extraktes mit $Al(OH)_3$.

Sämtliche wie angegeben gewonnenen Auszüge wurden gesammelt und wie folgt bearbeitet. Etwa $^1/_5$ der gesammelten Extraktmenge

wurde auf 24 Stunden mit der 10proz. Gewichtsmenge $Al(OH)_3$ stehengelassen (Aufgußmethode). Zu unserer Verwunderung gab die am Morgen abfiltrierte Lösung I (vgl. das zur Veranschaulichung des Arbeitsganges beigelegte Schema) alle Reaktionen des Extraktes (s. o.) mit *Ausnahme der von Millon.* Offenbar spaltete das amphotere $Al(OH)_3$ von den gelösten Substanzen nur *Tyrosin* ab, worin also eine Erscheinung der *Wahlverwandtschaft* zu sehen ist.

Das Filtrat I wurde wiederum, analog dem Gesamtextrakt, mit $Al(OH)_3$, wie angegeben, behandelt. Da stellte sich wiederum eine Erscheinung der Wahlverwandtschaft des $Al(OH)_3$ heraus, die wir dieses Mal schon mit gewisser Begründung erwarteten: Dem Filtrat II von der zweiten „Adsorption" *fehlte nur die Biuretreaktion*; es wurde also *quantitativ* der Biuretkomplex abgespaltet.

Die merkwürdige Erscheinung der Wahlverwandtschaft des Aluminiumhydroxyds wiederholte sich auch weiter. Dem Filtrat III von der dritten „Adsorption" *fehlte*, im Vergleich zu II, *die Reaktion von Ostromyslenski*; es wurde offenbar ein polypeptidartiger, noch näher zu untersuchender Körper abgespalten, der nur durch diese Reaktion charakterisierbar ist. — In analoger Weise unterscheidet sich das Filtrat IV von III *nur* durch das *Ausbleiben der Reaktion von Adamkewitsch*, was auf eine quantitative Abscheidung von *Tryptophan* hindeuten würde, wenn für dasselbe nur diese Reaktion charakteristisch wäre, was, wie wir sahen, nicht der Fall ist.

Das Filtrat IV gab, wie auch zu erwarten war, nur die Reaktionen von *Molisch* und *Pettenkofer*; es enthält somit nur die dem Fibrin beigemengten krystallinischen Kohlenhydrate, die der irreversiblen Adsorption, wie uns zahlreiche Versuche lehrten, unfähig sind. Eine *Kontrolladsorption* des Filtrates IV mittels $Al(OH)_3$ bestätigte die Richtigkeit dieser Annahme.

Die bei obiger *sukzessiver Fraktionierung* des Pepsin-Fibrinpeptons gewonnenen *Zahlendaten* sind in beistehender Tabelle I (vgl. S. 439) zusammengefaßt, während die Tabelle II (vgl. S. 439) eine vergleichende *Übersicht der Farbenreaktionen* der beschriebenen Filtrate repräsentiert.

Die Daten der Tabelle I geben die Möglichkeit, die *Ausbeute* an den einzelnen Fraktionen zu *berechnen*, was nach der bekannten Formel von *Gurwitsch*[1]) geschieht, und zwar wie folgt: Nach der Formel von *Gurwitsch* haben wir:

$$X = \frac{100\,(c - c')}{100 - c'}$$

Bezeichnen wir nun die bei jeder der beschriebenen „Adsorptionen" vom $Al(OH)_3$ aufgenommenen Substanzmengen mit X, Y, Z und T

[1]) Zeitschr. f. physik. Chem. 1913, S. 323.

in Grammen; bezeichnen wir ferner mit c, c', c'', c''' und c'''' die entsprechenden Konzentrationen des Extraktes und der aus ihm gewonnenen Filtrate, so erhalten wir:

$$X = \frac{100\,(c - c')}{100 - c'} = 0{,}9338 \text{ g oder } 26{,}87\,\% \text{ Tyrosin.}$$

$$Y = \frac{100\,(c' - c'')}{100 - c''} = 0{,}1962 \text{ g oder } 15{,}79\,\% \text{ Biuretkörper.}$$

$$Z = \frac{100\,(c'' - c''')}{100 - c'''} = 0{,}2436 \text{ g oder } 19{,}60\,\% \text{ eines noch zu erforschend. Aminokörpers.}$$

$$T = \frac{100\,(c''' - c'''')}{100 - c''''} = 0{,}3606 \text{ g oder } 29{,}01\,\% \text{ Tryptophan oder ein ihm verwandter Körper (s. o.).}$$

Tabelle I.

Methodische Behandlung des alkoholischen Peptonextraktes mit $Al(OH)_3$

Eigenschaften der Lösung:	Vor	nach der Behandlung I.	II.	III.	IV.	V.
Farbe		Strohgelb		Blaßgelb		Farblos
Drehungswinkel	−0°,5	−0°,21	−0°,14	−0°,07	−0°,14	−0°,14
Konzentration	1,2423	0,9116	0,7168	0,4743	0,1140	0,1143
Spez. Drehung	−40°,83	−24°,72	−19°,34	−14°,61	−23°,34	−23°,77

Tabelle II.

Farbenreaktionen der bei der methodischen Behandlung des Peptonextraktes mit $Al(OH)_3$ gewonnenen Filtrate.

Farbenreaktionen der Lösung:	Vor	nach der Behandlung I.	II.	III.	IV.	V.
Millon	+	—	—	—	—	—
Biuret	+	+	—	—	—	—
Ostromyslenski	+	+	+	—	—	—
Adamkewitsch	+	+	+	+	—	—
Molisch	+	+	+	+	+	—
Pettenkofer	+	+	+	+	+	+

Die Ausbeute an Pepton bei der Verdauung des Fibrins ist bekanntlich gering[1]). Doch sehen wir, daß man das *Fibrin*, über das Pepton als Übergangsbrücke, durch Extraktion mit Alkohol und darauffolgende sukzessive Behandlung mit Aluminiumhydroxyd, also durch *gelinde Hydrolyse mittels* $Al(OH)_3$ *quantitativ* und ohne jegliche Zersetzungsprodukte in seine *Komponenten* zerlegen kann. Wir zweifeln nicht daran, daß diese Fraktionierungsmethode sich auf die übrigen Peptone, und demnach auch auf die entsprechenden Proteine, wird ausdehnen lassen.

---

[1]) *Oppenheimer*, l. c. S. 462—463.

C. Behandlung des Extraktionsrückstandes mit $Al(OH)_3$.

Die wässerige Lösung des Extraktionsrückstandes wurde, wie bereits angegeben, mit Aluminiumhydroxyd behandelt, wobei folgende Resultate erzielt wurden:

Eigensch. d. Lösung:	vor Behandl. m. $Al(OH)_3$	nach Behandl. m. $Al(OH)_3$
Drehungswinkel	$-0°,3$ (Sacch.)	Inaktiv
Konzentration	0,2534	0,0060
Spez. Drehung	$-81°,25$	—
Farbenreaktionen. . . .	Xanthopr. u. *Lieberm.*	Keine einzige Reaktion
Farbe der Lösung . . .	Gelb	Farblos

Aus diesen Daten erhellt, daß der in Alkohol unlösliche Teil des Fibrinpeptons besteht: 1. Aus einem zur Zeit für Tryptophan gehaltenen Körper, dem aber die Reaktion von *Adamkewitsch* fehlt (s. o.), und 2. aus den im Ausgangspepton enthaltenen 2,31% Aschenbestandteilen.

Es sei zuletzt bemerkt, daß während der andauernden Erwärmung des Peptons mit Alkohol (s. o.) eine wenn auch unbedeutende Zersetzung der Substanz nicht ausgeschlossen ist, da der Extraktionsrückstand bräunliche, in Wasser unlösliche Produkte enthält, die von uns vorläufig nicht untersucht wurden, da die Menge derselben hierzu nicht ausreichte.

V. Schlußbetrachtung.

Die Daten der Fraktionierung des Fibrinpeptons nach obigem Schema sind, wie wir sahen, in Prozent in bezug auf das alkoholische Extrakt ausgedrückt. Da es doch von Interesse wäre, diese Daten mit den der durchgreifenden Hydrolyse des Fibrins, wie dieselbe seinerzeit von *Abderhalden* und *Voitinovici*[1]) sowie von *Arnold Brunner*[2]) ausgeführt wurde, zu vergleichen, so geben wir die von uns erhaltenen Zahlendaten auch in Prozent in bezug auf das Fibrinpepton selbst an, und sind dieselben die folgenden:

Nr.	Die in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Körper	(% auf Pept.)
1	*Millon*	9,58
2	*Biuret*	16,30
3	*Ostromyslenski*	11,88
4	*Adamkewitsch*	17,60
5	*Liebermann*	38,41
6	*Molisch*	} 5,29
7	*Pettenkofer*	
8	Asche	0,90
	Summa	99,96

Anmerkung. Da die nähere Zusammensetzung der Peptonfraktionen noch zu untersuchen ist, so bezeichnen wir dieselben als „Körper" nach den von ihnen aufgewiesenen Reaktionen (Biuretkörper, Millonkörper usw.).

[1]) *E. Abderhalden* und *A. Voitinovici*, Weitere Beitr. zur Kenntnis d. Zusammens. d. Prot. Zeitschr. f. physik. Chem. 52, 368. 1907.

[2]) *A. Brunner*, Hydrol. d. Fibr. Inaug.-Diss. Berlin 1905.

Die gewonnenen 5 stickstoffhaltigen Fraktionen des Peptons entsprechen, wie man sieht, den auf dem Wege der durchgreifenden Hydrolyse gewonnenen Aminosäuren, und so ist es natürlich eine unserer nächsten Aufgaben, *die Verteilung der einzelnen Aminosäuren unter den 5 erhaltenen Fraktionen des Peptons* festzustellen.

Nach den Farbenreaktionen erscheint das Fibrin, wie wir a. a. O. bewiesen haben, wenigstens qualitativ als vollwertiges Protein; von diesem Standpunkte aus muß unter den Produkten der durchgreifenden Hydrolyse auch *Tryptophan* vorhanden sein, was vorläufig nicht bewiesen ist. Bei der gelinden Hydrolyse des alkoholischen Peptonauszuges mittels $Al(OH)_3$ tritt die Tryptophanfrage noch ernster auf, da wir eben nicht wissen, ob das Tryptophan im Extrakt oder im Extraktionsrückstand zu suchen wäre (s. o.). — Sollte es aber gelingen, aus einer der Peptonfraktionen Tryptophan abzuscheiden, so würde das eine interessante Methode der Darstellung des Tryptophans ohne Vermittlung der tryptischen Verdauung sein.

Die beschriebene Eigenschaft der *Wahlverwandtschaft* scheint Aluminiumhydroxyd speziell in *alkoholischer Lösung* aufzuweisen, da wie einer von uns bewies, in wässeriger Lösung eine quantitative Abspaltung einer bestimmten Peptonkomponente stattfindet, weshalb $Al(OH)_3$ von neuem auf das Filtrat nicht mehr wirkt. *Abderhalden* ist es bekanntlich gelungen, mit den bei der durchgreifenden Hydrolyse gewonnenen Aminosäuren usw. nicht nur das Stickstoffgleichgewicht am Tiere und Menschen für die Dauer zu erhalten, sondern auch Zunahme des Körpergewichtes zu erzielen, und so zweifeln wir nicht daran, daß diese Versuche mit den nach obigem Schema gewonnenen Proteinkomponenten mit gleichem Erfolg verlaufen werden.

Die Fehler der Chlorbestimmung nach der Bangschen Mikromethode.

Von

Richard Prigge.

(Aus der Medizinischen Klinik des Bürgerhospitals zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 11. März 1922.)

Während die *Bang*sche Methode zur Mikrobestimmung der Chloride von mancher Seite als der exakteste aller überhaupt existierenden Wege zur quantitativen Chloranalyse im Blut und Serum bezeichnet wird, wird sie von anderen immer wieder völlig abgelehnt, da der mögliche Fehler bei der Verwendung so geringer Mengen von Untersuchungsmaterial auf das Resultat gar zu ungünstig einwirke; es wird dabei ganz übersehen, daß dieser Fehler der Gesamtmenge des zu bestimmenden Chlors durchaus entspricht und daß es sich höchstens darum handeln kann, festzustellen, ob er — innerhalb der gleichen Größenordnung — höher oder geringer als bei den übrigen Methoden ist. Daß es so lange nach dem Bekanntwerden dieser Methode noch nicht gelungen ist, ihren Wert für die Untersuchungen der physiologischen Chemie festzulegen, bleibt immerhin verwunderlich. Es soll daher im folgenden versucht werden, eine knappe Analyse der Fehlerquellen dieser Methode zu geben und den Weg zu zeigen, auf dem sie soweit eingeschränkt werden können, daß ein möglichst hoher Grad von Genauigkeit erreicht wird.

1. Der Fehler, der beim Wiegen des Blutes oder Serums gemacht wird, ist außerordentlich klein. Die Torsionswage (von Hartmann & Braun, Frankfurt a. M.) arbeitet mit hoher Präzision; bei den im Laboratorium üblichen Temperaturschwankungen entsprechen die Abweichungen der Nullpunktseinstellung selten mehr als 0,1 mg. — Da man bei den Wägungen 2 mal ablesen muß (erst das Gewicht des Blättchens ohne, dann mit Blut), so wird bei Ablesung auf ganze Milligramm der Fehler höchstens 2 mal $^1/_2$ mg betragen. Bei einer Torsionswage mit 1 mg Intervall kann übrigens noch gut 0,5 mg abgelesen werden, zumal durch den die Skala begleitenden Spiegelbogen der parallaktische Fehler ausgeschlossen wird. — Der Verdunstungsfehler

ist in den *Bang*schen Originalveröffentlichungen genügend behandelt; er ist ebenfalls so gering, daß er vernachlässigt werden kann. Um den Ablese- und Verdunstungsfehler ganz zu vermeiden, habe ich versucht, eine Bestimmung nach Volumprozenten statt nach Gewichtsprozenten durchzuführen. Die *Bang*sche Methode, deren Ausführung sehr billig ist und nur sehr wenig Material erfordert, kann in vielen Laboratorien nicht ausgeführt werden, da die Anschaffungskosten für die Torsionswage zu hoch sind. Bei einer Bestimmung nach dem Volumen fallen diese jedoch ganz weg. Ich habe für diesen Zweck eine lange Pipette von 0,2 ccm Gehalt in 200 Teile graduieren lassen, sodaß jedes Intervall 1 cmm entspricht. Es ist hierbei zu beachten, daß die Pipette am oberen Ende zugespitzt und kuppelförmig abgeschliffen sein muß und daß vor allem das Lumen am *oberen* Ende zu einer möglichst dünnen Capillare ausgezogen sein muß[1]). Nur so läßt sich erreichen, daß man die Blutsäule an jedem beliebigen Teilstrich festhalten kann, ohne daß die Ausflußgeschwindigkeit beeinträchtigt wird. Wenn das Lumen am oberen Ende der Pipette ebensoweit wie in ihrem Meßbereich ist, rutscht die Flüssigkeit langsam aber stetig nach. Dem billigen Preis dieses Instrumentes steht als Nachteil gegenüber, daß beim Ausfließen der Pipette ein aliquoter Teil der Flüssigkeit an den Wänden hängen bleibt, und zwar im Durchschnitt auf 100 cmm, also je nach dem spezifischen Gewicht etwa 105 mg — wie sofortige Wägung mit der Torsionswage zeigt — 2 mg, manchmal sogar noch mehr, bis 4 mg. Selbstverständlich muß die Spitze der Pipette vor Beginn der Messung von dem überstehenden Blut befreit werden und am Schluß der noch anhaftende Tropfen sorgfältig abgestreift, d. h. mit Hilfe des zur Untersuchung verwandten Löschblättchens abgesogen werden.

2. *Bang* hat angegeben, es genüge nach Beendigung der Chlorextraktion das Blutblättchen noch einmal mit der gleichen Menge Alkohol zu übergießen und diese mit dem ersten Extrakt zu vereinigen, um die nach dem ersten Abschütten zurückbleibende Chlormenge zu gewinnen. Untersuchungen über die Verteilung von künstlich dem Blut zugeführtem Chlor, bei denen es mir nie gelang, das zugesetzte Chlor innerhalb der übrigen Fehlergrenzen genau quantitativ wiederzubestimmen, ließen mich an obiger Angabe zweifeln. Ich titrierte daher die beiden Alkoholmengen getrennt und konnte zunächst mit *Bang* nur eine außerordentlich geringe Menge Cl in dem zweiten Abguß finden (etwa 0,03 ccm $^{n}/_{100}$-$AgNO_3$ oder noch weniger entsprechend). Als ich dagegen dazu überging, den zweiten Alkoholüberguß nochmals einige Stunden über dem Blutblättchen stehenzulassen, stellte es sich heraus, daß sich nunmehr eine sehr beträchtlich höhere Menge NaCl im zweiten Alkoholaufguß

[1]) Eine solche Pipette ist als G. K. G. M. angemeldet und wird durch die Firma F. u. M. Lautenschläger, Berlin N. 39, Chausseestr. 96 hergestellt.

befindet, als wenn man gleich wieder von dem Blutblättchen abgießt. Zur vollständigen Gewinnung des Chlors bedarf es somit unbedingt einer zweiten Extraktion, da bei der ersten nicht alles Chlor aus dem Blut ausgelöst wird. Nun klärte sich auch die Unmöglichkeit auf, zum Blut zugesetztes Chlor quantitativ wiederzufinden; bei dem künstlich hyperchlorämisch gemachten Blut war die Menge des infolge bloß einmaliger Extraktion nicht mitbestimmten Chlors und somit der Fehler entsprechend höher als bei dem weniger konzentrierten unvorbehandelten Blut: von dem Chlorzusatz wurde also eine gewisse Portion nicht mitbestimmt.

3. Mit Recht hat *Bang* festgestellt, daß in alkoholischer Lösung bei Verwendung von Kaliumchromat als Indikator schon nach Zusatz ganz geringer Mengen von Silbernitrat (0,05—0,06 ccm $^{n}/_{100}$-$AgNO_3$) ein scharfer Farbenumschlag ins Braune auftritt. Aber auch hier muß eine Einschränkung gemacht werden: Wenn nämlich die Alkoholmenge, in der die Titration vorgenommen wird, 10 ccm nicht wesentlich überschreitet. Verwendet man, wie es durch die Originalvorschrift erforderlich gemacht wird, größere Mengen, so wird der Umschlag sehr bald ungewiß, und man muß beträchtlich größere Mengen Silbernitratlösung zufügen, bis man den beschriebenen braunen Farbton in gleicher Intensität erhält. Man kann diese Tatsachen leicht am sog. Leerumschlag studieren. Wird die Titration mit Chlorlösungen ausgeführt, so wird der Fehler natürlich sehr groß, wenn der Umschlägspunkt, auf den bei dieser Methode alles ankommt, nicht genau feststeht und wenn ein zu geringer Wert für die zum Umschlag verbrauchte Maßflüssigkeit bei der Rechnung abgezogen wird. Wie man sieht, fallen die unter 2. und 3. besprochenen Fehler in entgegengesetzte Richtung und heben sich bis zu einem gewissen Grade gegenseitig auf. Deshalb hat die Methode in ihrer bisherigen Form schon sehr brauchbare Resultate ergeben; die Fehler treten erst dann störend in Erscheinung, wenn sie für exakte physiologisch-chemische Untersuchungen verwandt werden soll.

Um den hier besprochenen Mißstand zu beseitigen, habe ich versucht, die Alkoholmenge, in der die Titration stattfindet, zu verringern. Nach der *Bang*schen Vorschrift soll das mit Blut getränkte Blättchen von 16 × 26 mm soweit mit Alkohol überschüttet werden, daß die Maßflüssigkeit einige Millimeter über dem Blättchen steht. Da infolge der Rundung des Reagensglases unterhalb des Blättchens ein freier Raum bleibt, so braucht man hierzu ca. 10 ccm. Da die doppelte Menge (zweimaliges Übergießen) nötig ist, so ist die Grenze von 10 ccm soweit überschritten, daß eine scharfe Titration mit geringem Umschlagsquantum nicht mehr möglich ist. Ich habe daher versucht, das Alkoholquantum nach beendeter Extraktion und Zusammengießen der einzelnen

Fraktionen durch Kochen zu vermindern. Dabei wurde jedoch ein erhebliches und wechselndes Quantum NaCl an die Wände des Gefäßes niedergeschlagen und ließ sich dann für die Titration nicht recht wiedergewinnen. Verdunsten im Thermostaten bei 56° hat ebenfalls große Nachteile; vor allem muß man etwa 22 Stunden warten, bis der Spiritus genügend eingeengt ist.

Es blieb somit nichts anderes übrig, als die Menge des zur Extraktion verwendeten Alkohols selbst zu vermindern. Ich habe dies folgendermaßen erreicht: *Bang* schreibt vor, daß man zur Untersuchung nicht weniger als 80 mg und nicht mehr als 150 mg Blut verwenden soll (die Gründe hierfür siehe Originalarbeit); und zwar sollen diese von einem Blättchen von 16 × 26 mm aufgenommen werden; durch Verwendung halb so großer Blättchen wäre man also unter die Grenze der zur Untersuchung notwendigen Menge herabgegangen und hätte andererseits die Spiritusmenge wegen des unter dem Blättchen befindlichen freien Raumes noch nicht einmal auf die Hälfte herabgedrückt (die zur Extraktion verwendeten Reagensröhrchen haben eine lichte Weite von ca. 20 mm). Ich habe daher zu meinen Untersuchungen Blättchen von 19 mm Breite und 16 mm Höhe verwandt und habe sie außerdem, worauf es hauptsächlich ankommt, unten rund abgeschnitten, so daß sie der Rundung des Reagensglases anliegen. Hierdurch verschwindet der freie Raum unterhalb der Blättchen, und während ihre Fläche bloß um $^1/_3$ verkleinert wird, wird die zur Extraktion nötige Alkoholmenge um die volle Hälfte vermindert[1]). Es ist also möglich, die Untersuchungen an etwa 100 mg Blut auszuführen und somit innerhalb der von *Bang* vorgeschriebenen Grenzen zu bleiben.

4. Hat man somit die zur Titration zu verwendende Summe der beiden Extraktionsmengen auf ca. 10 ccm eingeschränkt, so genügen, um den Umschlag mit voller Schärfe hervorzurufen, bereits 0,04 ccm Maßflüssigkeit. Wahrnehmbar ist der Umschlag jedoch auch schon nach Zusatz von 0,03 ccm Silbernitratlösung. Bei Zugabe von noch kleineren Mengen (0,01—0,02 ccm) ist der Farbton jedoch noch nicht mit Sicherheit zu erkennen. Andererseits machen 0,05—0,06 ccm den Farbton noch nicht derartig viel tiefer, daß man dies anders als durch Vergleich mit einer nicht übertitrierten Lösung feststellen könnte. Darüber hinaus (0,07 ccm) sieht man allerdings auch schon ohne Vergleich, daß man stark übertitriert hat. Hieraus ergibt sich folgendes: In einer Titrierflüssigkeit möge soviel NaCl enthalten sein, daß zu seiner Ausfällung 0,92 ccm $^n/_{100}$-$AgNO_3$ nötig seien. Ist dann die Titrierung so ausgefallen, daß man in einem bestimmten Augenblick gerade 0,92 ccm Maßflüssigkeit zugesetzt hat, so bringt der nächste Tropfen (bei der mir zur Verfügung stehenden Mikrobürette ungefähr gleich 0,04 ccm)

[1]) 5 ccm 92 proz. Alkohols lösen noch etwa 12 mg NaCl.

den klaren Umschlag. Man liest 0,96 ab und findet durch Subtraktion von 0,04 den richtigen Wert. Ist dagegen in der Lösung das Äquivalent von 0,93 ccm $AgNO_3$ enthalten und hat man wieder 0,92 zugesetzt, so gibt der nächste Tropfen auch den Umschlag; man liest ebenfalls 0,96 ab, subtrahiert 0,04 und hat somit in der Bestimmung einen Fehler = − 0,01 ccm $AgNO_3$. Ist das Äquivalent von 0,91 in der Flüssigkeit, so ist bei 0,92 natürlich noch kein Umschlag wahrnehmbar, sondern ebenfalls erst nach Zusatz eines weiteren Tropfens, also bei 0,96. Fehler = +0,01. Hat man das Äquivalent von 0,90, so ist auch bei 0,92 der Umschlag noch nicht sichtbar: Fehler = + 0,02.

In diesen Abweichungen liegt die eigentliche Fehlerquelle der Methode. Immerhin ist sie außerordentlich klein. Die Abweichung vom wirklichen Wert schwankt nämlich nur zwischen + 0,0117 und — 0,00585 mg NaCl (nicht ±0,01, wie *Bang* angibt), d. h. man kann die zur Titration kommende NaCl-Menge mit einer Genauigkeit bestimmen, die bloß um etwa eine Einheit der zweiten Dezimale vom wirklichen Wert abweicht. Für die Errechnung des prozentualen NaCl-Gehaltes bedeutet dies, daß das Resultat um ca. + 0,015 und — 0,007 vom richtigen abweichen kann, wenn man die Bestimmung an etwa 80 mg Blut vorgenommen hat, um + 0,012 und —0,006 bei 100 mg Blut, und sogar bloß um +0,01 und — 0,005 bei 120 mg Blut.

Macht man große Reihenuntersuchungen mit demselben Blut, so findet man demgemäß bei Verwendung von durchschnittlich ca. 100 mg Blut, daß die Prozentresultate insgesamt um etwa 0,018 differieren; unter Berücksichtigung des oben Gesagten hat man es dann leicht, nahezu den wirklichen Wert zu finden, indem man von der höchsten Zahl 0,012 abzieht, oder zur niedrigsten 0,006 zuzählt. Bei den sonstigen Untersuchungen, von denen man an einem Blut selten mehr als 3 zur Kontrolle machen wird, ist dies natürlich nicht möglich.

Um die *Bang*sche Methode für Untersuchungen zu verwenden, die eine große Exaktheit erfordern, müssen also folgende Abweichungen innegehalten werden:

a) Statt der Löschblättchen 16 × 26 müssen solche von 19 × 16 mm verwendet werden; diese müssen unten rund abgeschnitten werden, so daß sie der Wölbung des Reagensglases (lichte Weite ca. 20 mm) angepaßt sind.

b) Verwendung von durchschnittlich ca. 100 mg Blut; bei einiger Übung lernt man die Saugfähigkeit des benützten Löschpapiers rasch kennen, so daß man der richtigen Blutmenge beim Beschicken sehr nahe kommt.

c) Verwendung von ca. 5 ccm Alkohol zum Übergießen der Blättchen (ergibt sich aus a).

d) Nach Beendigung der Extraktion gießt man den Alkohol in einen Titrierbecher und übergießt das Blättchen zum zweitenmal: diese Flüssigkeit darf nicht vor mehreren Stunden (ca. 2—3) abgegossen und mit der ersten vereinigt werden.

e) Hierauf wird nach der Originalvorschrift titriert; es genügt jedoch, von der verbrauchten Menge Silbernitratlösung 0,04 ccm abzuziehen (statt 0,05).

Anm. bei der Korrektur: Die soeben erschienene 3. Auflage der *Bang*schen „Mikromethoden" schlägt vor, recht enge Reagensröhrchen zu verwenden und mit bloß 5 ccm nachzuwaschen. Auch auf diesem Wege läßt sich die Menge des Alkohols einschränken.

Vergleichende Acetonbestimmungen im Urin.

Von

Kurt Käding.

(Aus der chemisch-physiologischen Abteilung des allgemeinen Krankenhauses Barmbeck, Hamburg.)

(Eingegangen am 27. März 1922.)

Den Bedürfnissen des praktischen Arztes entsprechend sind in letzter Zeit mehrfach quantitative Untersuchungsmethoden für Acetonbestimmungen im Harn bekannt gegeben worden. Hiermit sind die beiden Forderungen verbunden, daß die Untersuchungen erstens mit geringen Hilfsmitteln ohne umständliche Apparatur und der großen Inanspruchnahme unserer praktischen Ärzte entsprechend in kürzester Zeit ausgeführt werden und daß sie zweitens Anspruch auf Genauigkeit erheben können. Zur schätzungsweisen Untersuchung auf Aceton brauchen keine quantitativen Proben herangezogen zu werden. Denn wer häufiger Acetonproben anstellt, wird sich ein ungefähres Bild von der Menge des vorhandenen Acetons aus der Intensität der Verfärbung machen können, obwohl auch hier durch nicht ganz gleichmäßiges Ausführen der Reaktion oder durch Inkonstanz der Reagentien Irrtümer unterlaufen können; d. h. beim Ausführen der Reaktion stets gleiche Kubikzentimeter- oder Tropfenzahl, gleiche Tropffläche, gleichstarke Reagentien. Die Temperatur spielt hierbei eine zu vernachlässigende Rolle, da große Temperaturschwankungen im Untersuchungszimmer im allgemeinen nicht vorkommen. Auf Aceton wird der Praktiker wohl hauptsächlich beim Diabetes mellitus untersuchen, wobei er sich meistens mit der quantitativen Bestimmung des Zuckers begnügt. Es wäre aber ein großer Irrtum, aus dem Zuckergehalt auf einen entsprechenden Acetongehalt schließen zu wollen. Finden wir doch öfter bei 1% Zucker schon viel Aceton im Urin, während andererseits z. B. bei 5% Zucker noch kein Aceton aufzutreten braucht. Es sei mir hier gestattet, kurz die üblichen Anschauungen über die Entstehung des Acetons noch einmal wiederzugeben.

Beim Menschen tritt das Aceton hauptsächlich beim Diabetes mellitus auf, kann jedoch auch aus anderen Gründen in größeren Mengen im Urin ausgeschieden werden, während kleinere Mengen bis zu 10 mg pro

Tag als normal anzusehen sind. Bei Nichtdiabetikern kommt Acetonurie zustande bei Ausschluß der Kohlehydrate aus der Nahrung oder überhaupt im Hungerzustande.

Als Quellen der Acetonkörper werden jetzt in erster Linie die niederen Fettsäuren angesehen. Und zwar kommen hierbei nach *Blum* und *Baer*[1]) nur die Fettsäuren mit geraden Zahlen von Kohlenstoffatomen in Betracht. „Dies beruht auf dem für den Abbau aromatischer Fettsäuren zuerst von *F. Knoop* ermittelten Gesetz, daß die Oxydation stets am β-Kohlenstoffatom ansetzt [*von Noorden*[2])]. „Dabei darf die Kohlenstoffkette noch nicht weitgehend oxydiert sein [*F. Umber*[3])]. Jedoch können auch Fettsäuren höherer Ordnung wie Palmitinsäure, Stearinsäure und Ölsäure zur Acetonkörperbildung dienen. Von den Eiweißkörpern, die eine Zeitlang allgemein als Acetonbildner angesehen wurden, sind nur als Gelegenheitsquellen die Aminosäuren (Leucin, Tyrosin und Phenylalanin) nach *Embden*[4]) anzusehen. Nach den Arbeiten von *Embden, Fischler* und *Kossow*[5]) ist die Bildung des Acetons an die Leber gebunden; *Embden* und *Isaak*[6]) kamen in ihren Versuchen zu dem Schluß: „Kohlenhydratabbau zu Milchsäure und Acetessigsäurebildung während der Durchströmung der Leber diabetischer Tiere stehen in einem variierenden Verhältnis, insofern bei ausbleibendem Kohlenhydratabbau sehr viel Acetessigsäure auftritt und umgekehrt bei vorhandem Abbau der Kohlenhydrate die Acetessigsäurebildung sehr gering ist.“ Nach *Embden* und *Isaak* stellen die β-Oxybuttersäure und die Acetessigsäure normale intermediäre Stoffwechselprodukte dar. Sehen wir die Bildung des Acetons im menschlichen Organismus aus β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure als die einzige Entstehungsursache an, so gewinnt diese Anschauung *Embdens* eine an Gewißheit grenzende Wahrscheinlichkeit dadurch, daß ja auch normalerweise im Urin Spuren von Aceton ausgeschieden werden.

Hiernach besteht also das Entstehen der Acidose auf dem mangelnden Abbau der Acetonkörper. Die frühere Bezeichnung der *antiketogenen* Wirkung verschiedener Substanzen, wie zunächst der Kohlenhydrate und der Milschsäure, die physiologisch die größte Rolle bei der Verhinderung der Acidose spielt, dann der n-Valeriansäure, Amino-n-capronsäure, Isobutylessigsäure [*Embden* und *Wirth*[7])], der dem Glykogen nahestehenden Glykuronsäure und ähnliche, des Alkohols [*Neubauer*[8]), *Benedikt*[9])] usw. wäre hiernach unzutreffend, man täte besser, von einer *ketodialysierenden Wirkung* zu sprechen.

Es ist nun nicht meine Absicht, hier sämtliche Acetonreaktionen aufzuzählen. Die älteren bekannten Reaktionen hat *Bohrisch*[10]) 1907 beschrieben. Es soll hier das Ergebnis der vergleichenden Untersuchungen nach der Frommer-Engfeldt-Czonkaschen und der Schallschen Methode mitgeteilt und im Anschluß daran kurz neuere quantitative Methoden der Acetonbestimmung besprochen werden.

Da es sich bei der von uns angewandten Methode um eine Modifikation der von *Frommer*[11]) und *Engfeld*[12]) angegebenen handelt, so sollen die genauen Vorschriften dieser beiden Autoren hier zuerst noch einmal angeführt werden.

Die von *Frommer* und *Emilewicz* angegebene Salicylaldehydprobe beruht auf der Fähigkeit des Acetons, mit Salicylaldehyd bei Gegenwart von Alkalihydrat ein rotfarbiges Kondensationsprodukt, das Bis-o-oxybenzalaceton zu bilden nach folgender Formel:

$$OC\langle^{CH_3}_{CH_3} + 2\,OHC \cdot C_6H_4(OH) = OC\langle^{CH:CH \cdot C_6H_4(OH)}_{CH:CH \cdot C_6H_4(OH)}.$$

Es werden 10 ccm Urin mit 1 g festem Kaliumhydroxyd versetzt und, ohne die Auflösung abzuwarten, mit etwa 10—12 Tropfen Salicylaldehydlösung auf 71° erwärmt. Beim Vorhandensein von Aceton bildet sich am Boden an der Berührungsstelle der beiden Substanzen ein ausgesprochener roter Ring, der nur bei Anwesenheit von Aceton zutage tritt. Wird die Probe mit Salicylaldehyd versetzt, nachdem bereits das KOH vollständig in Lösung gegangen ist, so nimmt die Flüssigkeit erst eine gelbe, nachdem rötliche, später purpurrote und beim längeren Stehen eine dunkelrote, karmoisinartige Farbe an. Beim Erwärmen treten die Farbveränderungen rascher auf. Bei Anwesenheit von Aceton bleibt die Farbe des Urins fast unverändert. Im Harn direkt angestellt, gibt die Salicylaldehydreaktion sehr gute Resultate, allerdings rät der Verfasser an, nur dann einen Harn auf Grund der direkt ausgeführten Reaktion als acetonhaltig zu bezeichnen, wenn er mit Salicylaldehyd einen tiefroten Ring gibt, da man auch bei einem erwiesen acetonfreien Harn einen rosafarbenen Ring erhalten kann. Im letzeren Falle bekommt man mit Salicylaldehyd im Harndestillat keinen gefärbten Ring, ein Zeichen, daß der frühere Harn doch eine Substanz enthalten hat, welche mit der *Frommer*schen Probe positiv, wenn auch nur schwach reagiert, und mit Wasserdämpfen nicht flüchtig ist.

Die *Engfeldt*sche Modifikation besteht darin: auf 10 ccm Harndestillat werden 5 g fester Kalilauge sowie 5 Tropfen konzentrierter Salicylaldehydlösung gegeben und die Mischung dann auf ein Wasserbad von 50° gesetzt, das allmählich bis zum Sieden erhitzt wird. Nach der Auflösung des KOH läßt man die Mischung erkalten, wobei je nach dem Acetongehalt eine orange bis rotfarbige Krystallmasse durch die ganze Lösung entsteht.

Von den untersuchten Körpern, die im Harn oder Harndestillat vorkommen können, haben Formaldehyd, Acetaldehyd, Ameisensäure, Milchsäure, Phenole und Alkohol ein negatives Resultat ergeben.

Wir haben unsere Untersuchungen folgendermaßen ausgeführt: 50 ccm Harn werden mit 200 ccm Wasser verdünnt, 2 ccm 25proz. Schwefelsäure und einige Siedesteinchen zugefügt, die Vorlage in Eis gut gekühlt und destilliert. Der Destillationsprozeß gilt 20 Minuten nach Übertritt des ersten Tropfens in die Vorlage als beendet. Es wurde bei jedem Versuch nachgeprüft: im Rückstand war aber nie mehr Aceton nachweisbar. Von großer Wichtigkeit zeigte es sich, daß, wie ja auch schon bekannt, zum Destillieren eingeschliffene Glasstopfen verwandt

werden. Wir haben mehrere Vergleichsdestillationen mit eingeschliffenem Glasstopfen und mit Gummistopfen angestellt und dabei stets einen Verlust an Aceton feststellen müssen. So wurde z. B. bei einem Versuche mit Glasstopfen 0,034 Aceton gefunden, während mit Gummistopfen in demselben Urin, gleichzeitig destilliert, nur 0,014 Aceton ins Destillat übergegangen waren. Sodann wurde die Salicylaldehydprobe angestellt, und zwar wurden vier Röhrchen verwandt. Röhrchen 1 und 2 waren Vergleichs-, 3 und 4 Versuchsröhrchen. 1 und 2 wurden mit 1 ccm einer Lösung beschickt, der 0,05 bzw. 0,005 Aceton enthielt. In Röhrchen 3 wurde 1 ccm nativen Urins gegeben, in Röhrchen 4 je nach der Verdünnung soviel Kubikzentimeter Destillat, daß es 1 ccm Urin entsprach, bei der üblichen Verdünnung also 4 ccm. Sodann wurden jedem Röhrchen je 1 ccm 100proz. Kalilauge und je 2 ccm Salicylaldehydlösung zugesetzt, gut durchschüttelt und 20 Minuten auf einem Wasserbade von 45—50° erwärmt, während des Wasserbades noch mehrere Male gut geschüttelt*). Je nach der Intensität der Verfärbung wurden dann die Acetonlösung aus Röhrchen 1 oder 2 als Vergleich benutzt. Auch hier beobachteten wir, daß die Vergleichslösungen sich zur Aufbewahrung nicht eignen. Auf Eis aufbewahrt war der Acetongehalt schon am nächsten Tage nicht mehr konstant, wie aus verschiedenen Nachprüfungen hervorging. Der Gehalt an präformiertem (Röhrchen 3) Aceton und des Gesamtaceton (Röhrchen 4) wurde dann in der üblichen Weise colorimetrisch bestimmt.

Mit den Resultaten dieser Methode, die als eine sehr exakte quantitative gilt, wurden dann die Ergebnisse verglichen, die wir nach der von *Schall*[13]) angegebenen, zur quantitativen präzisierten *Legal*schen Probe erhielten.

Ich lasse zunächst die Vorschriften von *Schall* folgen:

Zunächst wird durch die Eisenchloridreaktion festgestellt, ob Acetessigsäure vorhanden ist oder nicht. Im letzteren Falle genügt die quantitative Acetonbestimmung. Ist viel Acetessigsäure vorhanden, so ist die Ammoniakbestimmung vorzunehmen; ist wenig Acetessigsäure vorhanden, so ist diese (eventuell neben dem Aceton) zu bestimmen.

Quantitative Acetonbestimmung: Man gibt 10 ccm einer selbstbereiteten 2proz. Acetonlösung zu 89,5 ccm geklärten Normalharn und setzt 0,5 ccm Acid. carbol. liquef. hinzu. Dieses ist eine 2proz. haltbare Vergleichslösung (Schall). Man nimmt zwei 100 ccm fassende Mensuren A und B von gleicher Weite mit Kubikzentimetereinteilung und

*) Die Erwärmung bis auf 50° findet wegen des niedrigen Siedepunktes des Acetons (56,5°) statt; da bei stärkerer Erhitzung die Möglichkeit eines Acetonverlustes sehr gesteigert wird.

stellt sie vor einen weißen Hintergrund. In A mißt man mit der Pipette 1 ccm obiger Acetonlösung ab, in B 1 ccm des zu untersuchenden mit Tierkohle geklärten Urins ab. Hierauf bringt man in A und B je drei Tropfen einer 33 proz. Nitroprussidnatriumlösung, dann je vier Tropfen einer 50 proz. Kalilauge und hierauf unter jedesmaligen Umschütteln je 15 Tropfen Eisessig. Nach $^1/_4$ Minute, um ein Verblassen des Reaktionsgemisches nicht eintreten zu lassen, wird A rasch mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt und B solange mit Wasser verdünnt, bis im durchfallenden Lichte Farbengleichheit zwischen A und B erreicht ist. Steht die Flüssigkeit nun in B bei x ccm, so beträgt der gesamte Acetongehalt x . 0,04%.

Es wurden nun eine Reihe Vorversuche gemacht, da ganz abgesehen von der Genauigkeit die Ausführung auf eine Reihe Schwierigkeiten stieß. Im Vordergrunde stand das äußerst schnelle Verblassen der Versuchs- als auch der Vergleichslösung. Wir änderten diese Methode daher etwas ab, wodurch wir sie sowohl zu vereinfachen als auch, wenn überhaupt möglich, zu präzisieren glaubten.

Zur Vergleichsflüssigkeit soll nach *Schall* Normalharn verwandt werden. Erstens hat der praktische Arzt nicht immer Normalharn in genügender Menge zur Hand, zweitens muß der Harn geklärt werden und drittens treten durch normalerweise im Harn auch vorkommende Substanzen leicht Farbveränderungen auf, die die bedingte Brauchbarkeit der Methode noch weiter herabsetzen, wenn nicht völlig entwerten. Vielleicht sind im Urin normalerweise Substanzen vorhanden, die eine gute Löslichkeit des Acetons verhindern; wenigstens ist die mit Nitroprussidnatriumlösung, Kalilauge und Essigsäure versetzte wässerige Acetonlösung farbbeständiger als die mit geklärtem Harn angesetzte, wenn auch nur in geringem Maße. Wir verwandten also an Stelle des geklärten Harns destilliertes Wasser, das bei der weiteren Verarbeitung eine brauchbare Vergleichslösung ergab, wenngleich der Farbton auch manchmal etwas zum Karmoisinrot überging, jedoch nur minimal.

Ferner stellte es sich heraus, daß durch die Konzentration der Kalilauge die Konstanz des Farbtones stark beeinträchtigt wurde. Je stärker die Konzentration, desto haltbarer die Intensität der roten Farbe. Wir verwandten mit gutem Erfolg eine 100 proz. Kalilauge. Ein weiterer nicht unwesentlicher Punkt ist die Art des Vergleichens. *Schall* verdünnt das zu untersuchende Harngemisch so lange, bis Farbengleichheit mit der Vergleichslösung besteht. Hierbei muß ständig umgeschüttelt werden, da sonst keine gute Durchmischung und somit auch keine gleichmäßige Farbe in den verschiedenen Schichten erhalten wird. Wir colorimetrierten deshalb in der üblichen Weise, indem wir Versuch und Vergleich bis 50 auffüllten und entweder vom Versuch oder vom Vergleich ablaufen ließen bei Benutzung der *Hänerschen* Zylinder. Schließ-

lich setzten wir nicht 15 Tropfen, sondern 0,5 ccm Eisessig zu, wodurch die Menge genauer bemessen wird als durch eine leicht ungleiche Tropfengröße. Mit diesen beiden Methoden erhielten wir nun die Resultate, die aus folgender Tabelle ersichtlich sind:

Tabelle I.

Nach Schall g in 100 ccm Urin		Nach Frommer-Engfeldt-Czonka			Lfd. Nr.
		g in 100 ccm Urin		zu %	
		Pr. Acet.	Ges. Acet.		
gelblich rosa	0,032	0,006	0,110	1,4	1
gelblich rosa	0,029	0,004	0,056	1,4	2
gelblich rosa	0,0225	0,004	0,005	1,4	3
	0,125	0,005	0,015	2,2	4
	0,175	0,003	0,007	1,8	5
	0,500	0,003	0,010	2,2	6
	0,110	0,003	0,009	1,6	7
	0,225	0,004	0,074	—	8
	0,210	0,005	0,034	—	9
	0,375	0,004	0,077	1,6	10
	0,118	0,004	0,009	—	11
	0,058	0,004	0,009	7,2	12
	0,105	0,025	0,045	—	13
gelb	0,025	0,003	0,009	—	14
	0,168	0,017	0,134	3,2	15
	—	0,009	0,012	1,6	16
	0,090	0,005	0,014	—	17
	0,270	0,010	0,056	—	18
gelblich	0,050	0,004	0,003	—	19
grau	—	0,008	0,002	—	20
	0,260	0,009	0,071	0,2	21
	0,190	0,004	0,014	—	22
	0,113	0,005	0,026	—	23
	0,195	0,004	0,023	—	24
gelbgrau	—	0,005	0,004	—	25
rotgelb	0,06—0,07	0,008	0,016	—	26
grau	—	0,006	—	—	27
	0,120	0,008	0,022	—	28
	0,037—0,05	0,003	0,005	—	29
	0,05 ca.	0,003	0,004	—	30
	0,100	0,003	0,005	—	31
	—	0,003	—	0,3	32
	—	0,003	—	—	33
wässrig rosa	—	0,002	0,002	—	34
wässrig rosa	0,058	0,003	0,005	—	35
	—	0,003	0,001	—	36
	—	0,002	—	—	37
	—	0,001	—	—	38
	0,125	0,002	0,006	—	39
	0,200	0,003	0,012	0,2	40
	0,080	0,003	0,008	—	41
	0,070	0,001	0,0025	5,6	42
gelblich	0,05 ca.	0,002	0,0027	5,6	43

Pr. Acet. = Präformiertes Aceton; Ges. Acet. = Gesamtaceton; Zu % = Prozentgehalt an Zucker.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, sind genaue zahlenmäßige Übereinstimmungen zwischen der *Frommer-Engfeldt-Czonka*schen Methode und der nach *Schall* nicht festzustellen, obwohl stets dieselben Versuchsbedingungen zugrunde gelegt waren. Es läßt sich lediglich daraus ersehen ob nur geringe Mengen Aceton oder ein höherer Acetongehalt vorhanden ist. Bei den Versuchen 1—3 waren die Vorschriften von *Schall* genau befolgt, also auch noch Carbolsäure zugesetzt worden, die jedoch auf die Haltbarkeit der Vergleichslösung absolut keinen Einfluß hatte. Ohne Carbolsäurezusatz sahen wir bei Verwendung von destilliertem Wasser, 100proz. Kalilauge und Eisessig eine relativ sehr gute Konstanz des Farbtones. War der Acetongehalt nach *Schall* ungefähr über 70 mg in 100 ccm, so blieb die rote Farbe bestehen, auch bei gewöhnlicher Zimmertemperatur, während bei niedrigerem Gehalt die Farbe stets in ein wässeriges Rosa und bei einem Gehalt von unter 50 mg nach *Schall* in eine gelbliche Tönung überging. (*Schall* führt diese Farbänderung auf eine Temperatur über 10° zurück. Nach ihm besteht ein Abhängigkeitsverhältnis zwischen der Acetonkonzentration und der Menge der verwandten Natriumnitroprussidlösung.) Hieraus konnte schon immer auf einen sehr niedrigen Acetongehalt geschlossen werden, da die *Schall*sche Methode schon früher beendet war als die Destillation und die nachherige Verarbeitung mit Salicylaldehyd. Vor der Verdünnung mit Wasser war im allgemeinen diese Farbänderung nicht feststellbar, sondern es trat stets ein schöner tiefroter Farbton auf, der aber bald bei niedrigem Acetongehalt schon nach Zusatz von nur wenigen Kubikzentimeter Wasser in eine der schon oben erwähnten Nuancen umschlug. Trotzdem füllten wir noch bis 50 ccm auf und colorimetrierten. Diese Resultate sind natürlich nicht genau, sondern nur Schätzungswerte, da hier zwei verschiedenfarbige Gemische miteinander verglichen wurden. Weiter geht aus der Tabelle hervor, daß die rote Färbung bei der Schallschen Methode hauptsächlich aus dem aus der Acetessigsäure gebildetem Aceton stammt und nicht von dem präformiertem Aceton (dem schon als Aceton ausgeschiedenem Aceton). Nach den Angaben von *Schall* ergibt die Acetessigsäure einen 5,55 mal intensiveren Farbton nach der *Legal*schen Probe als das Aceton. Ferner zeigt die Tabelle, daß in einigen Fällen der Gehalt an präformiertem Aceton einen höheren Wert ergab als das Gesamtaceton. Hier muß zunächst an einen Fehler in der Technik gedacht werden. Deshalb wurden diese Versuche alle wiederholt, jedoch stets mit demselben Ergebnis. Zum Teil wurden die Versuche erst am nächsten Tage nachgeprüft, wobei sich dann das schon oben erwähnte Ergebnis des Verlustes an Aceton trotz Aufbewahrens auf Eis herausstellte. Aber auch dann erhielten wir höhere Werte für präformiertes als für Gesamtaceton. Um festzustellen, ob der Fehler vielleicht in der Apparatur oder in dem

Aufbau derselben zu suchen sei, wurden auf Grund dieser Feststellungen mehrfach Vergleichdestillationen mit bekanntem, selbstbereitetem Acetongehalt angestellt, wobei sich jedoch ergab, daß kein Aceton durch die Destillation verloren ging, wenn mit Glasschliffstöpsel gearbeitet wurde. Dieses Mehr an präformiertem Aceton ließe sich also nur dadurch erklären, daß doch noch andere Substanzen als Aceton mit Salicylaldehyd die Acetonreaktion ergaben, wie auch schon *Frommer* festgestellt hat (s. o.). Jedoch war in diesen Fällen kein Rosaring, sondern auch stets ein tiefroter Ring aufgetreten.

Unter Vernachlässigung dieser Fehlerquelle ist die *Frommer-Engfeldt-Czonka*sche Methode als eine sehr brauchbare zu bezeichnen. Die Bestimmung des präformierten Acetons ist ja vielleicht interessant und auch wissenswert, weil aus der Differenz von Gesamtaceton und präformiertem Aceton und Multiplikation mit 1,76 der Acetessigsäuregehalt berechnet werden kann. Jedoch hält der Anstieg des präformierten Acetons nicht gleichen Schritt mit dem des Gesamtacetons, wie aus unserer Tabelle hervorgeht. Zur Beurteilung der Acidose ist für den Kliniker gerade das Gesamtaceton das wichtigste. Sie ist auch deshalb als eine sehr brauchbare zu bezeichnen, weil wir imstande sind, mit ihr kleinste Mengen Aceton zu bestimmen. Dabei ist die Methode schnell ausführbar; bei Vorhandensein der nötigen Apparatur beansprucht sie ungefähr eine Stunde. Man kann sich in dringenden Fällen schnell mit ihr orientieren, falls wissenschaftliches Interesse vorliegt. Im anderen Falle wird der Arzt bei vorliegendem schweren Koma mit Acetonurie auf die genaue Mengenbestimmung des Acetons verzichten.

Über die anderen neueren, sogenannten quantitativen Untersuchungsmethoden möchte ich noch einige Worte sagen. Nicht eingehen werde ich hier auf die genauen quantitativen Untersuchungen, erwähnen will ich unter anderen nur die von *Richter-Quittner*[14]). *Richter* hält eine zweimalige Destillation für erforderlich, aus folgenden Gründen: „Erstens werden durch den Wasserdampf die kleinsten Acetonmengen mitgerissen, so daß sicher jeder Substanzverlust ausgeschlossen ist, zweitens wird eine zu große Konzentration des Harns vermieden, die bekanntlich sehr schädlich ist. Die fraktionierte Destillation hält *Richter* für notwendig, um das Aceton (Siedepunkt 56,3) vom Äthylalkohol (Siedepunkt 78°) zu trennen."

Soweit ich in der Literatur habe feststellen können, ist in den letzten zwei Jahren über neue quantitative Bestimmungen ohne Destillation für den Praktiker geschrieben worden von *Schall*[15]), *Adler*[16]), *Koopmann*[17]) und *Scharf*[18]). *Citron*[19]) hat 1920 einen Destillierapparat für qualitative Acetonbestimmung bekannt gegeben, da er auch qualitativ eine Acetonprobe nur für einwandfrei hält bei einem destilliertem Urin (der Apparat scheint nach der Abbildung sehr einfach und praktisch zu sein).

Außer der von uns angewandten hat *Schall*[15]) noch über Mengenbestimmung des Acetons mittels des *Authenrieth*schen Colorimeters gearbeitet. Der Apparat als solcher würde der Enführung dieser Methode guten Boden bereiten, weil den meisten Ärzten das Arbeiten mit dem *Authenrieth*schen Colorimeter von der Hämoglobinbestimmung her bekannt ist, falls der verhältnismäßig hohe Preis von der Anschaffung nicht abschrecken würde. Diese Methode beruht auf der Beobachtung *Schalls*, daß die beste Konzentration der Nitroprussidnatriumlösung dann vorliegt, wenn auf 1 ccm einer 1 proz. Acetonlösung 0,5 ccm konzentrierte Natriumnitroprussidlösung verwandt werden. Der Laugenzusatz ist für die Reaktion weniger wichtig, wenn nur eine genügend saure Reaktion zustande kommt. Weiter ist hier von Wichtigkeit die Gleichmäßigkeit der Temperatur, die nicht über 10° betragen soll, da wie oben schon erwähnt, bei wärmerer Temperatur ein Umschlag ins Gelbliche eintritt. Um diesem vorzubeugen, werden die Reagensgläser in einen Trog mit 10° warmen Wasser gestellt. Bei Anwesenheit von Acetessigsäure kompliziert sich diese Methode wie auch die anderen.

In dem Aufsatz *Adlers* ist beachtenswert die Bemerkung, daß für den Praktiker Unterschiede von 10 und 100 mg im Liter keine Rolle spielen. Damit ist, was Genauigkeit anbetrifft, vom Verfasser selbst schon das Urteil gesprochen. Für annähernde Bestimmungen wird sie jedoch in bestimmten Konzentrationsbreiten zu gebrauchen sein, da als Standardlösung ein konstant bleibendes Farbgemisch verwandt wird. *Adler* nimmt 10 ccm einer Neutralrotlösung (1 : 1000 + 3 ccm Neublaulösung (1 :1000) + 0,6 ccm Diamantlösung D (1 : 100) + 5 ccm destilliertes Wasser. Diese Lösung entspricht einem Acetongehalt von 0,1%. Davon werden die Verdünnungen gemacht. Von dem zu untersuchenden Urin werden 10 ccm genommen, 1 ccm 20 proz. Kalilauge, $^1/_2$ ccm 33 proz. Natriumnitroprussidlösung und unter Umschütteln 20 Tropfen Eisessig hinzugefügt. *Adler* hat damit ganz gute Resultate gesehen. Für den Arzt, der nicht sehr häufig Acetonbestimmungen macht, wird die Anschaffung und Bereitung der obigen Standardlösung schon zu umständlich sein, um dieser Methode in der Praxis allgemeine Verbreitung zu verschaffen.

In seiner Arbeit: „Aceton in der Cerebrospinalflüssigkeit“ erwähnt *Koopmann* eine von *Mauban* beschriebene Modifikation der *Lieben*schen Probe (Jodoformbildung mit *Lugol*scher Lösung und Alkali), die in Form einer Ringprobe anzustellen ist. *Koopmann*[20]) hat schon 1917 auf die Notwendigkeit hingewiesen, genau auf die Zeit der Ringbildung zu achten. Sie ist verschieden für verschiedene Substanzen, die ebenfalls die *Lieben*sche Probe geben. *Koopmann* hat die Zeitpunkte für das Auftreten der Ringbildung festgestellt bei Aceton, Alkohol und Milchsäure. Er fand dabei allerdings bemerkenswerte Unterschiede. Die

Mehrdeutigkeit der Probe läßt sie jedoch meines Erachtens für den Praktiker als ungeeignet erscheinen.

Eine anscheinend praktische Methode ist die von *Scharf* angegebene Präzisierung der *Legal*schen Probe, deren Exaktheit jedoch noch nicht erprobt ist. Bei genauer Innehaltung der Vorschriften scheint sie indes für den Praktiker geeignet zu sein. *Scharf* fand, daß bei einer bestimmten Verdünnung sehr schnell ein Verblassen auftrat, wie auch aus unseren Untersuchungen hervorging. Darauf baut er seine Methode auf. Als Wertgrenzen stellte er fest: Nicht durchscheinend bis dunkelkirschrot über 0,5%, innerhalb 10 Minuten nicht verblassend 0,1—0,5%, weinrot, mindestens 3 Minuten beständig 0,05—0,1%. „Durch Verdünnen des zu untersuchenden Harns auf das 2-, 4-, 10-, 20fache usw. wird man nun bis zu jenem Ausgangswert zu gelangen suchen, bei welchem die Reaktion deutlich dunkelweinrot ausfällt und 3—5 Minuten bestehen bleibt."

Wir hatten die untere Grenze der Farbbeständigkeit bei ungefähr 50—75 mg gefunden. Jedoch erwies sich die *Schall*sche Modifikation bei höherer Konzentration als ungenau. Nach den Untersuchungen von *Scharf* liegt der Umschlag der Farbe bei einem Acetongehalt von 0,04 bis 0,06%, würde also dem unsrigen ziemlich nahekommen. Jedoch fehlen bei *Scharf* die vergleichenden Bestimmungen durch Destillation, die als einzige Grundlage für eine genaue Bestimmung des Acetons anzusehen ist.

Zusammenfassend können wir also sagen: Die Bestimmungen nach der *Schall*schen Methode halten einer genauen quantitativen Acetonbestimmung durch Destillation nicht stand. Schon durch die gewöhnliche qualitative *Legal*sche Probe läßt sich bei der nötigen Übung ein gewisser Überblick über den Wechsel des Acetongehalts gewinnen. Er kann durch eine der zuletzt angeführten Methoden noch etwas verbessert werden, ohne daß diese jedoch einen Anspruch auf Genauigkeit erheben können, wie wir es zu wissenschaftlichen Zwecken verlangen müssen. Die Methode von *Scharf*, dem übrigens die *Schall*schen Arbeiten unbekannt zu sein scheinen, da die seinige nur eine weitere Aus- resp. Umarbeitung der *Schall*schen Methode darstellt, bedarf noch einer genauen Nachprüfung und würde bei einem günstigen Ergebnis sich zur weiteren Einführung in die ärztliche Praxis wohl am besten eignen, da sie sich durch große Einfachheit auszeichnet und nur die in jedem Sprechzimmer vorhandenen Reagentien erfordert.

Zum Schluß möchte ich noch Herrn Dr. *Feigl* für die liebenswürdige Anregung und Anleitung zu dieser Arbeit herzlichst danken.

Literatur.

[1]) *Blum* und *Baer*, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **59**. 1908. — [2]) *von Noorden*, Die Zuckerkrankheit. Berlin 1917. — [3]) *Umber*, Ernährung und Stoffwechselkrankheiten. Berlin 1914. — [4]) *Embden*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **11**. 1908. — [5]) *Fischler* und *Kossow*, Arch. f. klin. Med. **111**. 1913. — [6]) *Embden* und *Isaak*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **99**. 1917. — [7]) *Embden* und *Wirth*, Biochem. Zeitschr. 1910. — [8]) *Neubauer*, Münch. med. Wochenschr. 1906, S. 790. — [9]) *Benedikt* und *Török*, Zeitschr. f. klin. Med. 1906. — [10]) *Bohrisch*, Pharmaz. Centralhalle **48**. 1907. — [11]) *Frommer*, Berl. klin. Wochenschr. **42**. 1905. — [12]) *Engfeldt*, Berl. klin. Wochenschr. **18**. 1915. — [13]) *Schall*, Dtsch. med. Wochenschr. **8**. 1919. — [14]) *Richter-Quittner*, Biochem. Zeitschr. **93**. — [15]) *Schall*, Münch. med. Wochenschr. **29**. 1919. — [16]) *Adler*, Münch. med. Wochenschr. **26**. 1919. — [17]) *Koopmann*, Dtsch. med. Wochenschr. **18**. 1920. — [18]) *Scharf*, Med. Klin. **36**. 1921. — [19]) *Citron*, Dtsch. med. Wochenschr. **52**. 1920. — [20]) *Koopmann*, Nederlandsch Tijdschr. v. Geneesk. 1917.

Eine einfache Vorrichtung zur automatischen Registrierung der Hefegärung.

Von

Ernst Sieburg.

(Aus dem Forschungsinstitut für klinische Pharmakologie in Hamburg, Allgemeines Krankenhaus Eppendorf.)

(Eingegangen am 28. März 1922.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Unter Hefegärung sollen hier nicht die mannigfachen Vorgänge verstanden sein, die sich im Auftreten der verschiedenen chemischen Zwischenprodukte bei der Vergärung von Traubenzucker bis endlich zu Kohlensäure und Alkohol äußern können, sondern es soll nur der Endvorgang, die Kohlensäureentwicklung, betrachtet sein. Den quantitativen Verlauf der Gärung in dieser Hinsicht pflegt man meist durch Bestimmung der Zuckerabnahme oder Kohlensäurezunahme in bestimmten Zeitabständen festzulegen. Dazu bedarf es für einen Versuch stets ständiger Analysen, Ablesungen, Aufzeichnungen oder Umrechnungen. Einen Apparat zur graphischen Darstellung von Gärungsvorgängen, der das Volumen der durch die Hefearbeit erzeugten Kohlensäure mißt, hat *Hugo Schulz*[1]) beschrieben. Derartige Apparate mit elektrischem Beiwerk erweisen sich bei nur gelegentlicher Benutzung in der Hand des Ungeübten nicht immer als praktikabel.

Nachstehend beschriebene Vorrichtung, zu der außer den gewöhnlichen Hilfsmitteln des kleinen Laboratoriums nur ein auf langsame Gangart einstellbares Kymographion und die geringe Geschicklichkeit im kunstgerechten Biegen einer Glasröhre notwendig ist, kann sich jeder leicht zusammenstellen. Die Freunde der Mikromethodik mögen dabei gleichzeitig auf die geringen Mengen der benötigten Stoffe aufmerksam gemacht sein.

Das Wesentliche der Vorrichtung sind einige gleichartige U-förmig gebogene Glasrohre mit verschieden langen, beiderseits offenen Schenkeln. Die lichte Weite beträgt etwa 11 mm, so daß eine 1 cm hohe Flüssigkeitssäule darin einem Volumen von 1 ccm entspricht. Die

[1]) *H. Schulz*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **120**, 51. 1907.

Länge des kürzeren Schenkels bis zur Umbiegung beträgt etwa 13 cm, die des längeren etwa 18 cm.

In das Rohr werden zunächst 10 ccm Quecksilber gegeben, dann auf das Quecksilber in den kürzeren Schenkel 5 ccm der Zuckerlösung-Hefeaufschwemmung. Durch Neigen des Rohrs bringt man den Flüssigkeitsspiegel im kürzeren Schenkel bis fast an die Öffnung und verschließt dann mit einem Gummistopfen so, daß sich unter diesem gar keine oder nur eine minimale Menge Luft befindet. Jetzt ist der kürzere Schenkel des Rohrs ganz mit Flüssigkeit gefüllt: Oben mit dem Gärgut und unten mit Quecksilber, das auch die Biegung des Rohrs und den untersten Teil des längeren Schenkels ausfüllt.

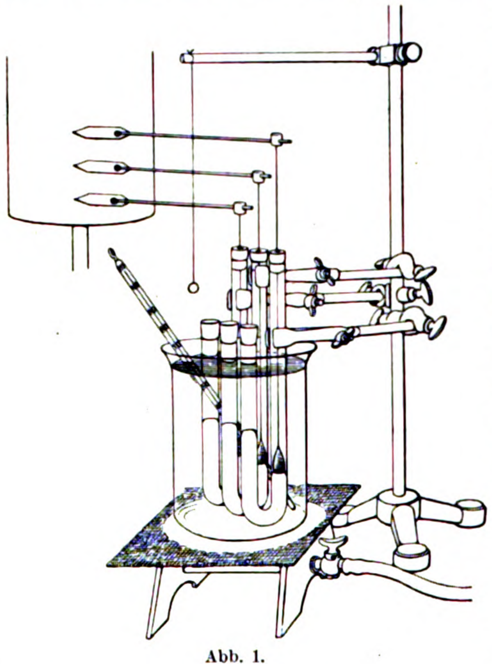


Abb. 1.

Auf das Quecksilber im längeren Rohrschenkel wird nur der Schwimmer aufgesetzt. Er besteht unten aus einem Kegel aus Siegellack, dessen Grundfläche einen um 1—2 mm geringeren Durchmesser als das Rohr hat. In die Spitze des Kegels ist ein möglichst wenig elastischer Metalldraht eingefügt, dessen oberes Ende einen Strohhalm als Schreiber trägt; dieser ist durch ein Korkstückchen mit dem Draht im rechten Winkel verbunden. Damit durch die Elastizität des Schwimmers bei Erschütterungen nur möglichst geringe Exkursionen des Schreibhebels entstehen können, verschließt man zweckmäßig den längeren Schenkel mit einer Korkscheibe, die eine kleine runde Öffnung in der Mitte zum Durchtritt des Drahtes trägt, jedoch ohne daß hier eine merkliche Reibung stattfinden kann.

2—3 Stück dieser so beschickten Röhrchen werden in geeigneter Weise am Stativ befestigt und ins Wasserbad von gewünschter Temperatur getaucht, das eventuell durch einen niedrigen Brenneruntersatz mit einem Stichflämmchen auf konstanter Temperatur gehalten wird. Dann werden die Spitzen der Schreiber in gewissem Abstand voneinander, der sich durch Verschieben der Korkverbindung zwischen Strohhalm und Draht des Schwimmers vor Beginn des Versuchs beliebig einstellen

läßt, vertikal übereinander an die berußte Trommel des Kymographions angelegt. Ein leichtes Lot drückt von oben die Schreiber sanft an die Schreibfläche an (Abb. 1). Den Gang des Kymographions stellt man auf sehr geringe Umdrehungsgeschwindigkeit ein, jedenfalls so, daß während der beabsichtigten Dauer des Versuchs, etwa bis zu 24 Stunden, die Trommelfläche ausreicht. Die Zeit wird etwa stundenweise auf einer Nullinie vermerkt.

Die Flüssigkeitsmengen müssen für die angegebenen Größenverhältnisse der Vorrichtung recht genau innegehalten werden. Das Gärgut besteht aus einer 0,75proz. Hefeaufschwemmung, die 0,75% Traubenzucker gelöst enthält; aus 5 ccm dieser Mischung, mit 0,0375 g $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$, können sich der Rechnung nach maximal etwa 8,5 ccm CO_2 (t^0, $p = 760$ mm Hg) entwickeln. Das feuchte Gas steht unter dem Druck einer Wassersäule von 5 cm, einer Quecksilbersäule von 100 mm plus dem jeweiligen Barometerdruck plus dem Gewicht des Schwimmers. Gasmengen von 8,5 ccm kommen bei dieser Anordnung aber nicht zur Beobachtung, sie betragen maximal bis gegen 6,5 ccm, meist aber noch weniger. Die gebildete Menge Gas läßt sich aus den Kurven durch Anlegen eines Millimetermaßstabes für jeden Moment des Prozesses ohne weiteres ablesen.

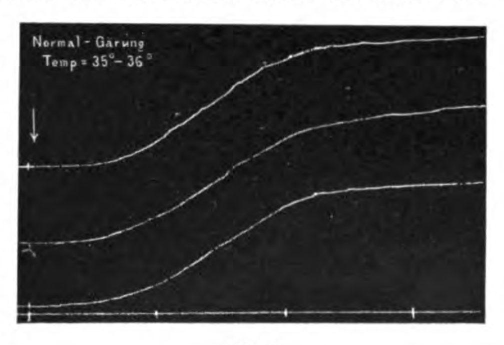


Abb. 2.

Je nach den Eigenschaften der benutzten Hefe und nach der Höhe der Temperatur fallen die Kurven recht verschieden aus, sowohl was die Latenszeit vor Beginn des Anstiegs, als auch was Steilheit und Höhe der Kurven selbst angeht. Die Steilheit ist ein Ausdruck der Geschwindigkeit, die Höhe ein Ausdruck des quantitativen Verlaufs des Prozesses. Da es sich bei dieser Art Messungen weniger um absolute Zahlen, als um Vergleiche handelt, kommt es auf die Beschaffenheit der Hefe und auf die Temperatur, selbst wenn diese im Verlauf des Versuchs um einige Grade schwanken sollte, weniger an. Bei der Anordnung mehrerer Gärröhrchen ist darauf zu achten, daß dasjenige, in dem die geringste Gasmenge erwartet wird, auf der Schreibfläche zu unterst sich markiert, und daß die stärkste oder schnellste Gasentwicklung sich als oberste Kurve verzeichnet.

Mit der Vorrichtung läßt sich die Gärkraft verschiedener Hefearten bei demselben Substrat, die Gärgeschwindigkeit verschiedener Zuckerarten bei Verwendung einer bestimmten Hefeart, die Beeinflussung des

Gärprozesses im beschleunigenden oder verlangsamenden Sinne durch verschiedene Substanzen und der Ablauf der Gärung bei Gegenwart von Hefegiften in verschiedenen Verdünnungen vergleichend demonstrieren.

Abb. 3.

Außer einer von 3 Gärröhrchen gleichzeitig registrierten Normalkurve (Abb. 2) seien hier zur Erläuterung der Leistungsfähigkeit der Vorrichtung einige automatisch registrierte Illustrationen[1]) zu den bekannten Beobachtungen von *Hugo Schulz*[2]) wiedergegeben. Die gerade durch Gärversuche unter der Einwirkung von Agentien in stärksten und schwächsten Konzentrationen gestützte Lehre, daß schwache Reize die Tätigkeit eines biologischen Objektes anregen, stärkste sie völlig lahmlegen können, ist hier an den Beispielen von Quecksilberchlorid (Abb. 3) und von Ameisensäure (Abb. 4) in quantitativer Hinsicht demonstriert.

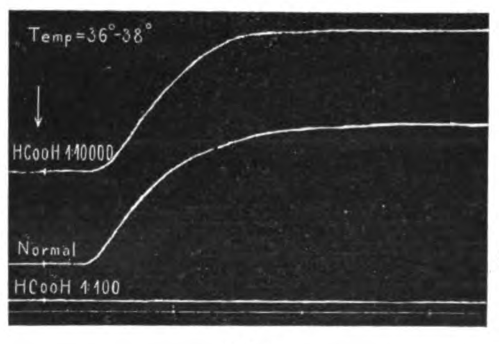


Abb. 4.

[1]) Die Kurven sind in der Reproduktion um die Hälfte verkleinert. Auf der untersten Geraden ist jedesmal die Zeit in Stunden markiert. — Abb. 3 Markierung im zweiten Ausschnitt nach 20 Stunden.

[2]) Siehe u. a. *H. Schulz*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **108**, 427. 1877; Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **42**, 517. 1888; vgl. auch *G. Hoffmann*, Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung der Ameisensäure, Inaug. Diss. Greifswald 1884; *E. Biernacki*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **49**, 112. 1890; *F. Johanessohn*, diese Zeitschr. **47**, 97. 1912.

Methode zur Bestimmung der Blutgerinnungszeit.

Von

W. Heubner (Göttingen) und **P. Rona** (Berlin)
(unter Mitarbeit von *C. Leineweber* und *H. Rhode*).

(Eingegangen am 29. März 1922.)

Mit 1 Abbildung im Text.

I.

Vor 2 Jahren teilten wir auf dem 32. Kongreß für Innere Medizin Erfahrungen über eine Methode mit, die sich uns bei Bestimmungen der Gerinnungszeit des Blutes bewährt hatte[1]). Die klinische Brauchbarkeit des vorgeschlagenen Apparats hatte damals *C. Leineweber* an dem Material der Göttinger Medizinischen Klinik erprobt. Nachdem die Frage für uns abgeschlossen schien, stellten sich bei weiteren klinischen Versuchen, vor allem in der Göttinger Frauenklinik (Dr. *Loenne*), unerwartete Schwierigkeiten ein, die eine erneute Durchprüfung des Verfahrens erforderten. Da aus äußeren Gründen die Bearbeitung des Themas nur mit Unterbrechungen weiterschreiten konnte, verzögerte sich die Gewinnung einer erschöpfenden Einsicht in die vielseitigen Tücken, die das scheinbar so einfache technische Problem bietet. Jedoch glauben wir nunmehr über so reiche Erfahrung zu verfügen, daß unsere Angaben auch anderen eine zuverlässige Anleitung bieten können. Die definitive Erledigung haben wir besonders der eifrigen und geschickten Mitwirkung von Herrn Dr. *Rhode* zu danken. Doch sind wir auch mehreren anderen Kollegen von den 3 großen Göttinger Kliniken Dank schuldig, die uns durch Zuweisung von Patienten, Teilnahme an den Beobachtungen oder Hergabe ihrer eigenen Person als Versuchsobjekt unterstützten; von ihnen seien wegen besonders lebhafter Beteiligung die Herren Dr. *Seyderhelm*, Dr. *Loenne* und Dr. *Peyser* genannt.

II.

Bei der Betrachtung der klinischen Literatur sind wir im Vergleich zu unseren eigenen Erfahrungen oft erstaunt gewesen, mit welcher Bestimmtheit bei Benutzung anderer Methoden genaue Zahlen für die

---

[1]) Verhandl. d. 32. Dtsch. Kongr. f. Inn. Med. zu Dresden 1920, S. 320.

Gerinnungszeiten angegeben werden. So sind wir z. B. bei Versuchen mit der Methode von *Fonio*[1]) stets in einem weiten zeitlichen Bereiche unsicher geblieben, wann wir nun Beginn oder Ende der Gerinnung notieren sollten, ganz abgesehen von den schweren theoretischen Bedenken, die gegen diese Methode vorzubringen sind[2]). Ebenso waren wir von der vielgelobten Methode *Bürkers*[3]) nicht voll befriedigt und sehen unsere Erfahrungen zum erstenmal in der Literatur bestätigt durch eine kürzlich erschienene Arbeit von *Jörgen Lehmann*[4]).

Lehmann konnte — genau wie wir — zuweilen abnorm frühzeitig ein vereinzeltes Gerinnsel auffischen, zuweilen aber auch nach eingetretener allgemeiner Gerinnung das Glasstäbchen durch den Blutstropfen führen, *ohne* daß ein Fibrinfaden haften blieb. Wir können seine Ausführungen nur unterstreichen: wir haben auch erlebt, daß bei durchaus vorschriftsmäßigem Verfahren gelegentlich an einer einzelnen Stelle des Blutstropfens eine vorzeitige *partielle* Gerinnung erfolgt; noch öfter mußten wir sehen, daß die ersten feinen Fibrinnetze durch den prüfenden Glasfaden zerrissen wurden, *ohne* an ihm zu haften.

Uns lag von vornherein daran, eine Methode anzuwenden, die einen zuverlässigen und möglichst scharfen *Endpunkt* liefert. Wenn ein Zeitraum gemessen werden soll, so müssen *2 Zeitpunkte* fixiert sein. Der Vorgang der Gerinnung beansprucht nun allerdings selbst einen gewissen *Zeitraum*, und streng physiologisch-chemisch dürften sowohl sein Anfang wie Ende zeitlich kaum faßbar sein. Die *Methode* muß also willkürlich einen gewissen *Grad* der Gerinnung herausgreifen und fixieren. Wir fanden bei vielfachen Bemühungen mit alten und neu erdachten Methoden, daß allein die Prüfung der *Tropfbarkeit* des Blutes unter gegebenen Bedingungen eine Antwort gibt, an der nicht zu deuteln ist. Nur die Unantastbarkeit des einzelnen Versuchsergebnisses gab uns die Möglichkeit, die Bedingungen hinreichend kennenzulernen, die für eine *methodische* Ausnutzung dieser Prüfungsweise innegehalten werden müssen, um wirklich vergleichbare *Reihen* von Zahlen zu liefern. Die meisten dieser Bedingungen sind bekannt; trotzdem werden sie sehr häufig vernachlässigt, was das Vertrauen zu den üblichen Bestimmungen der Blutgerinnungszeit nicht gerade erhöhen kann.

Kompliziertere Apparaturen haben wir allerdings nicht in den Kreis unserer Untersuchungen einbezogen. Wir wollen keineswegs daran zweifeln, daß z. B. das Koaguloviscosimeter von *Kottmann*[5]) oder der Apparat von *Cannon* und *Mendenhall*[6]) ebenfalls verläßliche Ergebnisse liefert.

Ein bestimmter Gerinnungsgrad kann dadurch definiert sein, daß er eine langsam strömende Blutsäule eben still stellt. Am bequemsten

[1]) Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chirurg. **27**, 642, 644. 1914; **28**. 313, 322. 1915.
[2]) Vgl. dazu auch *Frisch* und *Starlinger*, Wien. klin. Wochenschr. 1921, S. 344.
[3]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **118**, 452. 1907.
[4]) Skandinav. Arch. f. Physiol. **42**, 35. 1922.
[5]) Zeitschr. f. klin. Med. **69**, 415. 1910.
[6]) Americ. Journ. of physiol. **34**, 224. 1914.

ist die Beobachtung des Fließens und des Nicht-mehr-Fließens möglich an einer Hahnpipette, aus der man das Blut langsam abtropfen läßt. *Langsames* Tropfen ist vor allem deshalb notwendig, damit eine beschränkte Blutmenge für die ganze Zeitdauer bis zum Eintritt der Gerinnung ausreicht; ebenso ist es prinzipiell erwünscht, die Geschwindigkeit der Blutbewegung während eintretender Gerinnung möglichst niedrig zu halten, damit kein unkontrollierbarer *mechanischer* Einfluß ins Spiel kommt. Ob das Blut dauernd langsam strömt, oder ob es die längste Zeit vor eintretender Gerinnung ruht, ist für das Ergebnis belanglos, wie wir ausdrücklich festgestellt haben.

Die Änderung der „inneren Reibung“ des Blutes erfolgt ziemlich plötzlich; bis zum Beginn des eigentlichen Gerinnungsvorgangs ändert sich an den *inneren* Bedingungen der Blutströmung nichts, wie eine Reihe von Versuchen *Leinewebers* gezeigt hat: Er zählte dabei die Sekunden zwischen dem Fall der einzelnen Tropfen und fand die Intervalle sehr lange konstant, ehe sie bei Annäherung des Strömungsstillstandes größer wurden. Bei seinen Zahlen ist zu berücksichtigen, daß er die alte Form unseres Apparats benutzte, bei dem während des Strömens die Niveauhöhe merkbar sank und die Strömungsgeschwindigkeit aus *diesem* Grunde auch bei nicht gerinnenden Flüssigkeiten allmählich abnahm.

Als Beispiele solcher Zählungen seien folgende aufgeführt:

Versuch 1: Der erste Tropfen fällt ca. 50 Sekunden nach der Blutentnahme, die nächsten in Abständen von 4 mal 3, 39 mal 4, 7 mal 5, 5 mal 6, je 1 mal 7, 9 und 10 Sekunden, der letzte Tropfen also $5^1/_4$ Minuten nach der Blutentnahme.

Versuch 2: Der erste Tropfen wiederum 50 Sekunden nach Blutentnahme, darauf Abstände von 3, 3, 3, 4, 3, 3, 4, 4, 3, 3, 4, 3, 3, 4, 3, 3, 3, 3, 4, 3, 3, 3,'3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 4, 4, 4, 5, 5, 4, 5, 5, 6, 6, 8, 9, 13, 10, 12 Sekunden; Gerinnungszeit 4 Minuten.

Versuch 3: Der erste Tropfen ca. 220 Sekunden nach Blutentnahme, darauf Abstände von 3, 3, 3, 3, 3, 4, 4, 4, 3, 3, 3, 4, 3, 3, 3, 3, 3, 5, 4, 5, 4, 6, 5, 4, 4, 4, 4, 4, 5, 4, 4, 4, 3, 4, 4, 2, 4, 4, 4, 5, 5, 4, 4, 4, 3, 4, 6, 4, 15 Sekunden; Gerinnungszeit 7 Minuten.

Auch *Kottmann* fand mit seinem Koaguloviscosimeter die relativ plötzliche Steigerung der Viscosität während der Gerinnung von Normalblut.

Der Stillstand der Blutbewegung ist nicht ganz unabhängig von den *äußeren* Kräften, unter deren Einwirkung sie steht; wechseln diese, so können *verschiedene* Grade der Verfestigung — oder, was dasselbe ist, verschieden lange „Gerinnungszeiten“ — erforderlich sein, um Stillstand herbeizuführen. Aus diesem Grunde ist diesen äußeren Kräften Aufmerksamkeit zu schenken. Sie sind bei unserem Verfahren gegeben in der *Niveauhöhe* der tropfenden Flüssigkeit und in dem *Widerstand*, den das Abfließen findet. Der Widerstand gliedert sich in 2 Teile: Einmal die Abtropföffnung oder den Abtropfkanal, den die Flüssigkeit passieren muß, zweitens die Aufsatzcapillare, die wir der Tropfpipette beigegeben haben, um das Nachströmen von Luft zu erschweren und dadurch die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes zu verlangsamen. Wir haben anfangs die Bedeutung dieser äußeren Kräfte unterschätzt und noch in unserer früheren Mitteilung angegeben,

daß man durch Auswahl unter verschiedenen Aufsatzcapillaren die Tropfgeschwindigkeit nach Geschmack regeln könne. Inzwischen haben wir uns durch die Versuche von *Rhode* überzeugen lassen müssen, daß dies bei hohen Ansprüchen an die Exaktheit der Ergebnisse *nicht* erlaubt ist, sondern daß Niveauhöhe und Widerstand bei allen Vergleichsversuchen möglichst ähnlich zu wählen sind.

Den Abtropfkanal des Blutes selbst haben wir als Hauptwiderstand zur Verlangsamung der Strömungsgeschwindigkeit mit Absicht *nicht* benutzt; wir hatten dies — wie es naheliegt — bei unseren ersten Vorversuchen getan, kamen aber davon zurück, da die Reinigung einer hinreichend engen und langen Capillarstrecke uns zu große Schwierigkeiten bot. Doch spielt der Abtropfkanal natürlich insofern eine Rolle, als bekanntlich an Grenzflächen *früher* und *reichlicher* Fibrinkrystalle anschießen als inmitten des Blutes und infolgedessen die *engsten* Stellen des Apparats *zuerst* von einem so dichten Fibrinnetz durchsetzt werden, daß die Strömung der flüssigen Blutanteile unmöglich wird. Daher beobachteten wir auch im allgemeinen *Verkürzung* der Gerinnungszeit an Apparaten, an denen nichts geändert wurde, als daß die Ausflußöffnung die Form einer kurzen engen Capillare erhielt[1]).

Um den Einfluß des Niveaus und des Abtropfkanals möglichst gleichmäßig zu machen, haben wir die früher von uns verwendete Form der Tropfpipette, wie sie in Dresden demonstriert und in der Dissertation von *Leineweber* abgebildet wurde, dadurch abgeändert, daß die Ampulle kurz und weit, der Abtropfkanal aber zu einem 8 ccm langen, gleichmäßig weiten Rohr von $1^1/_2$ mm Lumen gestaltet wurde. Die Änderung bewährte sich sehr gut. Die beim Gebrauch des Apparats noch vorkommenden Niveauunterschiede haben nun keinerlei merkbaren Einfluß mehr auf das Ergebnis. Die Aufsatzcapillare ist dadurch zu definieren, daß sie unter einem Druck von etwa 500 mm Hg je Minute ein Quantum von 30—40 ccm Luft passieren läßt; wenigstens sollen die in den Handel kommenden Apparate in Zukunft nur solche Capillaren erhalten. Das Intervall der Blutstropfen im Apparat liegt dann bei mittlerer Niveauhöhe zwischen 5 und 8 Sekunden: die Ausflußgeschwindigkeit aus der Pipette soll bei *hohem* Niveau 2—3, bei niedrigem 3—4, im Mittel also 3 Minuten je Kubikzentimeter betragen. Dies gilt für Blut wie für Wasser; man kann also mit Wasser die Capillaren bequem auf richtige Dimensionen prüfen.

III.

Bekanntlich ist die *mechanische* und *chemische* Behandlung des Blutes bedeutsam für die Geschwindigkeit der Gerinnung. Wir haben viel Arbeit darauf verwandt, die Entnahme und Überführung des Blutes

[1]) Vgl. dazu *Carl Leineweber*, Methodische Untersuchungen über die Bestimmung der Blutgerinnungszeit. Inaug. Diss. Göttingen 1920.

in den Apparat so schonend als möglich zu gestalten, um recht fehlerfrei zu arbeiten. Nach einem Vorschlag von Dr. *Erwin Schlagintweit* in München ließen wir Muster unserer Tropfpipette herstellen, deren Spitze konisch und für den Ansatz einer Kanüle passend zugeschliffen war; die Tropfpipette wurde dann mit aufgesetzter Kanüle zum Einstich in die Vene benutzt und das Blut durch Saugen am oberen Ende der Pipette unmittelbar in diese übergeführt. Dies Verfahren hat den großen Vorteil, daß eine Temperaturveränderung des Blutes kaum zu erfolgen braucht, weil das ausgeflossene Blut mit der Pipette sehr schnell in das Wasserbad getaucht werden kann.

Weiterhin bemerkten wir, daß die Sorte des *Glases*, aus dem der Apparat hergestellt wurde, für die Gerinnungszeit nicht gleichgültig ist. Bei Prüfungen am *gleichen* Blut trat z. B. in einem Apparat aus „Kriegsglas" die Gerinnung stets später ein als in einem solchen aus „Friedensglas". Am sinnfälligsten aber zeigte sich dieser Einfluß an einem Muster, das ursprünglich ganz aus Borsilicatglas geblasen worden war, dessen Einsatzgefäß aber zerbrach und aus gewöhnlichem „Thüringer" Glas nachbeschafft wurde; in diesem Apparat trat die Gerinnung des bereits abgetropften, in dem Einsatzgefäß gesammelten Blutes in grob wahrnehmbarer Weise bereits zu einer Zeit ein, als es aus der Pipette noch munter abtropfte. Nach den von *Deetjen*[1]) mitgeteilten Untersuchungen über das Verhalten der Blutplättchen auf Glas- gegenüber Quarzflächen nimmt der Unterschied verschieden resistenter Glassorten nicht wunder. Wir nahmen darauf Rücksicht durch Verwendung von Apparaten aus hochwertigem Glase bei unseren Bemühungen um ein maximal schonendes Vorgehen.

In einer Reihe von Versuchen wurden die gewöhnlichen Stahlkanülen durch solche aus Reinnickel mit einer Fassung aus Hartgummi ersetzt, die mit besonderer Sorgfalt gesäubert und nur für unsere Versuche gebraucht wurden.

Alle diese Bemühungen waren völlig vergeblich; denn sie hatten nur zur Folge, daß die Gerinnungszeiten — infolge Schonung der Blutplättchen — wesentlich verlängert wurden, ohne dabei *konstanter* zu werden. Die Konstanz des Ergebnisses wurde stets durch einen *Doppelversuch* derart geprüft, daß 2 Beobachter mit je einem Apparat im gleichen Augenblick Blut aus den beiden Armvenen desselben Menschen entnahmen und jeder für sich die Gerinnungszeit bestimmte. Offenbar treten bei einem solchen, übermäßig schonenden Vorgehen kleine Ungleichmäßigkeiten entscheidend auf, die sich nicht mehr beherrschen lassen, Stäubchen irgendwelchen Materials u. dgl. Überdies hat eine *lange* durchschnittliche Gerinnungszeit bei Gebrauch des Apparats ihre großen Nachteile; einmal ist eine Beanspruchung des Beobachters

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **63**, 1. 1909.

für mehr als 10 Minuten recht ermüdend; weiterhin müssen besondere Maßregeln gegen übermäßiges Absinken der Temperatur getroffen werden; endlich ist ein *dauerndes* Tropfen kaum möglich, weil die verwendete Blutmenge ja begrenzt sein muß und nur für eine gewisse Tropfzeit ausreicht. Ließe sich auch der letztgenannte Mangel durch zeitweiliges Schließen oder späteres Öffnen des Hahnes überwinden, so hatten wir doch hinreichenden Grund, die *schonende* Methode ganz zu verlassen und im Gegenteil danach zu streben, daß der Zerfall der Blutplättchen möglichst ausgiebig und rasch erfolge.

IV.

Versuche von *Rhode* richteten sich darauf, den Einfluß von *Alkali* auf die Gerinnungszeit zu bestimmen, da die Gerinnungsbeschleunigung durch gewöhnliche Glassorten auf deren Alkalescenz zurückgeführt wurde. Mit Rekordspritze wurde Blut in einer Menge von etwa 10 ccm aus menschlichen Venen entnommen und davon 2 oder 3 gleiche, abgemessene Proben in Schälchen entleert, die bereits vorher mit gleichen Mengen Wasser oder sehr verdünnter Natronlauge beschickt waren. Die verdünnten und hämolysierten Blutproben wurden dann (mit Assistenz) in möglichst kurzem Zeitraum in Tropfpipetten gleicher Form und Glassorte aufgesogen, die Apparate zusammengesetzt, in Wasserbäder gleicher Temperatur gebracht und der letzte Tropfenfall abgelesen. Verwendet wurden $^{n}/_{50}$-, $^{n}/_{100}$- und $^{n}/_{200}$-Natronlauge, weiterhin Verdünnungen, deren Wasserstoffzahl durch colorimetrischen Vergleich mit Phosphatgemischen definiert war, nämlich zu $p_H = 8{,}0$ und 7,6. Die Ergebnisse (vgl. Tabellen I u. II) sprechen dafür, daß Alkali *keinen* beschleunigenden, sondern höchstens einen *verzögernden* Einfluß auf die Gerinnung ausübt.

Tabelle I.

Frische Blutproben männlicher Individuen mit gleichen Teilen Wasser oder verdünnter Lauge versetzt; Gerinnungszeiten.

Nr.	Diagnose	Alter Jahre	Beobachtungstemperatur Grad	p_H der Verdünnungsflüssigkeit 7,0	7,6	8,0
4	Mitralinsuffizienz	30	37	$5^m\,30^s$	$5^m\,45^s$	**$5^m\,55^s$**
5	Dyspepsie	40	37	$5^m\,20^s$	$6^m\,20^s$	—
6	,,	37	30	$8^m\,55^s$	$10^m\,15^s$	**$10^m\,55^s$**
7	Cholelithiasis	45	30	$5^m\,35^s$	—	**$5^m\,40^s$**
8	Tbc. Hämoptoe	20	28	$9^m\,20^s$	$11^m\,20^s$	**$12^m\,20^s$**

Der Zusatz von Alkali erwies sich überdies als äußerst nachteilig für die Methode. Besonders bei den höheren Konzentrationen (Versuch 13 u. 14, Tabelle II) trat eine Eigentümlichkeit hervor, die eine scharfe Ablesung des letzten Tropfenfalls illusorisch machte, und die

auch bei geringerer Alkalikonzentration störend war: Während im allgemeinen das Intervall zwischen den einzelnen Tropfen bis kurz vor dem Stillstand konstant war (bei den hier benutzten Apparaten 6—10 Sekunden), verlängerte es sich nach Zusatz von $^n/_{50}$- und $^n/_{100}$-Natronlauge langsam mehr und mehr, um nach 30 bzw. 22 Minuten ein Maximum

Tabelle II.

Frische Blutproben mit gleichen Teilen verdünnter Lauge versetzt; Gerinnungszeiten.

Diagnose	Geschlecht	Alter Jahre	Beobachtungstemperatur Grad	Verdünnungsflüssigkeit	Parallelproben		
					A	*B*	*C*
Pyelitis	♀	20	33	$^n/_{200}$-NaOH	$7^m\ 20^s$	$7^m\ 20^s$	$7^m\ 20^s$
Nervös. Herzleiden	♂	30	30	„	$6^m\ 20^s$	$6^m\ 20^s$	$6^m\ 30^s$
„ „	♂	29	25	„	$10^m\ 30^s$	$10^m\ 15^s$	$10^m\ 40^s$
„ „	♂	40	20	„	$15^m\ 10^s$	$14^m\ 50^s$	$14^m\ 30^s$
Gastritis	♂	48	31	$^n/_{100}$-NaOH	(22^m)	(22^m)	(22^m)
Bronchitis	♂	24	35	$^n/_{50}$-NaOH	(30^m)	(30^m)	(30^m)

von 1—2 Minuten zu erreichen; danach wurden — *ohne* daß völliger Stillstand eintrat — die Intervalle wieder kürzer. Was dann aber tropfte, war kein Blut mehr, sondern *Serum*, das nach Alkalizusatz sehr rasch aus dem Fibrinfilz ausgepreßt wird. Nach Zusatz von $^n/_{200}$-NaOH begann dieses Tropfen von Serum 2—6 Minuten nach eingetretenem Stillstand, ohne Alkalizusatz erst viel später und spärlicher.

V.

Die Zahlen der Tabelle II liefern jedoch den Beweis, daß die Entleerung des aus der Ader gelassenen Blutes in *verschiedene* Porzellanschälchen und das Aufsaugen in verschiedene Apparate für das Ergebnis gleichgültig ist, daß aber dies Vorgehen günstige Bedingungen für eine Gerinnung in praktisch brauchbaren Zeiträumen schafft. Weitere gleichartige Versuche ergaben, daß Hämolyse und selbst Verdünnung des Blutes nicht notwendig ist, um konstante Ergebnisse zu erhalten; auch bei unverändertem Blut bewährt sich das gleiche Verfahren (vgl. Tabelle III).

Tabelle III.

Frische Blutproben männlicher Individuen; Gerinnungszeiten.

Nr.	Diagnose	Alter Jahre	Beobachtungstemperatur Grad	Blut zu gleichen Teilen verdünnt mit	Parallelproben		
					A	*B*	*C*
15	Dyspepsie	24	37	$^n/_{200}$-NaOH + 0,9% NaCl	$9^m\ 30^s$	$9^m\ 10^s$	$9^m\ 45^s$
16	Gastritis	38	37	0,9% NaCl	$8^m\ 55^s$	$8^m\ 55^s$	$8^m\ 30^s$
17	Coxitis	51	37	θ	$5^m\ 20^s$	$5^m\ 5^s$	—

Daher konnte in einem besonderen Versuche noch ausdrücklich festgelegt werden, daß es in der Tat einen beträchtlichen Unterschied ausmacht, ob das Blut unmittelbar in den Apparat aufgesogen oder die Umfällung in ein Schälchen zwischengeschaltet wird.

Versuch 18: Gleichzeitige Blutentnahme aus beiden Armvenen eines 42 jährigen Pleuritikers (unter strengem Einhalten gleicher Zeiten, vgl. unten); links fließt das Blut durch eine aufgesetzte Kanüle unmittelbar in die Tropfpipette des Gerinnungsapparats, rechts wird es aus der Rekordspritze in ein Porzellanschälchen entleert und daraus in eine zweite Pipette aufgesogen. Infolge der ausgiebigeren Berührung mit Luft sieht dieses Rechts-Blut wesentlich heller rot aus als das Links-Blut. Beide Apparate gleichzeitig in Wasserbäder von 37° getaucht. Letzter Tropfen des Rechts-Blutes fällt $7^3/_4$, des Links-Blutes $14^1/_2$ Minuten nach Blutentnahme!

Verfährt man dagegen bei einem solchen Doppelversuch beiderseits *gleichartig*, indem man die Umfüllung in Schälchen zwischenschaltet, so erhält man ausgezeichnet übereinstimmende Zahlen, während man — wie oben bereits erwähnt — bei dem *direkten* Verfahren häufig starke und schwer erklärliche Abweichungen findet. Versuche beider Art finden sich auf Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV.

Doppelversuche: Blutentnahme aus beiden Armvenen *desselben* Menschen im gleichen Augenblick unter möglichst gleichartigen Bedingungen. Apparate aus gleicher Glassorte und von gleicher Form.

Bei den Versuchen 19 und 20 wurde beiderseits mit Hohlmanschetten gestaut, die durch ein T-Rohr mit dem Druckapparat und untereinander kommunizierten. „Direkt“: beiderseits Aufsaugen des Blutes aus der Vene in die Tropfpipette; „indirekt“: beiderseits Blutentnahme mit Rekordspritze, Entleerung in Schälchen zwischengeschaltet.

Nr.	Diagnose	Geschlecht	Alter Jahre	Verfahren	Beobachtungstemperatur Grad	Gerinnungszeit links	Gerinnungszeit rechts
19	Hirnlues	♂	45	indirekt	30	$6^m\,25^s$	$6^m\,25^s$
20	normal (W. Hbr.)	♂	44	„	39	$6^m\,15^s$	$6^m\,30^s$
21	normal (Sch.)	♂	ca. 30	direkt	30	$9^m\,55^s$	$13^m\,50^s$
22	normal (Br.)	♂	26	„	30	$7^m\,15^s$	$12^m\,10^s$
23	normal (E.)	♀	ca. 25	„	30	$13^m\,35^s$	$11^m\,35^s$
24*)	Tbc.	♀	-	„	30	10^m	12^m
25*)	Gravida	♀	-	„	30	19^m	16^m

*) Aus der Dissertation von *Leineweber* entnommen, wo sich noch weitere Beispiele finden.

VI.

So gleichgültig demnach Unterschiede der Kanülen, Spritzen und Schälchen für die Gerinnungszeit zu sein scheinen, so bedeutsam sind andere Momente, deren sorgfältige Beobachtung unerläßlich ist, sofern man auf exakte Ergebnisse Wert legt. Dazu gehören vorwiegend die *Dauer der venösen Stauung* vor der Blutentnahme und zweitens die

Temperatur, der das Blut zwischen Entnahme und Gerinnung ausgesetzt ist.

Daß Stauung die Gerinnbarkeit des Blutes ändert, ist bekannt[1]). Wir erzielten beträchtliche Differenzen der Gerinnungszeit im Doppelversuch durch verschiedene Dauer der Stauung auf beiden Seiten.

Versuch 26: Derselbe Patient wie in Versuch 19 (Tabelle IV) erhielt 2 Manschetten von Blutdruckapparaten um die Oberarme gelegt; ihre beiden Ansatzschläuche wurden mit Hilfe eines T-Rohrs mit dem *gleichen* Gebläse und Manometer verbunden; der zum *linken* Arm führende Schlauch wurde abgeklemmt, darauf ein Druck von 120 mm Hg auf das Röhrensystem gelegt und dadurch die *rechte* Manschette komprimiert. Nach 5 Minuten wurde die Klemme links gelöst und nun nach etwa 10 Sekunden beiderseits *gleichzeitig* eine Rekordspritze in die gestaute Vene gestochen und Blut angesogen; es war links deutlich heller als rechts und floß fast doppelt so rasch in die Spritze ein. Gerinnung erfolgte bei 37° Badtemperatur links nach 5 Min. 33 Sek., in dem lange gestauten *rechtsseitigen* Blut bereits nach 3 Min. 15 Sek.!

Die Wichtigkeit der Temperatur für alle Gerinnungsbestimmungen hat vor allem *Bürker* nachdrücklich betont; auch wir können bestätigen, daß dieser Einfluß häufig viel zu sehr unterschätzt wird. Wenige Grade Unterschied bedingen *immer* meßbare Differenzen der Gerinnungszeit; jedoch nicht nur die gemessene Temperatur des Wasserbades muß bei allen Vergleichsversuchen übereinstimmen, sondern auch die Dauer und Intensität der Abkühlung *vor* Einsetzen in das Bad ist zu beachten. Es ist daher empfehlenswert, das Zeitintervall zwischen Blutentnahme und Einsetzen in das Bad möglichst konstant zu halten oder sonst durch vorherige Erwärmung und Warmhaltung der gebrauchten Gerätschaften eine Abkühlung ganz zu vermeiden. Belege für die Bedeutung der Temperatur gibt Tabelle V.

Tabelle V.

Frische Blutproben von männlichen Personen in 2—3 Portionen auf Schälchen verteilt, darin mit gleichen Mengen Flüssigkeit verdünnt, jede Portion in besonderem Apparat auf Gerinnungszeit geprüft.

Diagnose	Alter Jahre	Zusatzflüssigkeit	Temp. des Wasserbades Grad	In das Wasserbad getaucht	Portion A	Portion B	Portion C
Arteriosklerose	63	n/200-NaOH	39 37	gleichzeitig	$6^m\ 10^s$	$6^m\ 10^s$	7^m
Bronchitis	18	n/200-NaOH + 0.9% NaCl	38 36	"	$12^m\ 15^s$	14^m	$14^m\ 10^s$
Pleuritis	42	0,9% NaCl	38	*A* früher als *B* und *C*	$9^m\ 20^s$	$10^m\ 15^s$	$10^m\ 10^s$

[1]) Vgl. dazu *Morawitz* in Abderhaldens Handbuch der Biochem. Arbeitsmethoden Bd. V (1) S. 234. 1911. — Ferner *Wöhlisch*, Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. 27, 65. 1922.

Nicht ohne Bedeutung scheint endlich zu sein, ob die mit dem Blute vorgenommenen Prozeduren, also das Umfüllen aus der Spritze in den Apparat, annähernd im gleichen Tempo erfolgt; wahrscheinlich führt erst die damit verknüpfte *mehrmalige* Mischung und Berührung mit fremden Materialien endgültig zu raschem Zerfall der Blutplättchen u. dgl. Im Versuch 30 trat jedenfalls ein auffallender Unterschied bei *absichtlicher* Variation der Arbeitsweise hervor.

Versuch 30: Blutprobe aus der Armvene eines 22jährigen Neurasthenikers ohne Zusatz in 2 Schälchen verteilt, darauf die eine sofort, die andere nach kurzem Zögern in je einen Gerinnungsapparat aufgesogen; beide Apparate *gleichzeitig* in ein Wasserbad von 33°. Gerinnung der ersten Portion nach 6 Min. 15 Sek., der zweiten nach 7 Min. 5 Sek.

VII.

Der von uns in den letzten Untersuchungen stets benutzte Apparat und seine Verwendung seien nun nochmals im Zusammenhang beschrieben, nachdem die Begründung für das meiste im vorstehenden gegeben wurde:

6 D C 3 1 A 5 2 4 B

Unser Koagulometer[1]) besteht aus 4 gläsernen Teilen, von denen 2 durch Schliff, die übrigen durch Gummischlauch aneinandergefügt werden (vgl. Abbildung):

A. Die *Tropfpipette* ist das wesentlichste Stück: sie dient zum Aufsaugen des flüssigen Blutes und zur Beobachtung des Abtropfens und dessen Ende. Sie besteht aus einer Ampulle (1) von etwa 10 ccm Inhalt, einem abwärts davon angesetzten, ziemlich engen und langen Abtropfkanal (2) und einem aufwärts angesetzten Hahn (3).

B. Das *Einsatzgefäß* bildet eine kleine Flasche, in deren Hals das untere Ende der Tropfpipette eingeschliffen ist (4): sie trägt außerdem ein senkrecht aufsteigendes Glasrohr (5), damit sie unter Wasser getaucht werden kann, ohne die Kommunikation mit der Luft zu verlieren. Das Gefäß dient ausschließlich zum Auffangen des abtropfenden Blutes.

C. Die *Aufsatzcapillare* ist ein kurzes Capillarrohr mit einer sehr fein ausgezogenen Strecke, die dem Nachströmen von Luft in die Tropfpipette großen Widerstand bietet und dadurch das Abtropfen verlangsamt (vgl. oben S. 465f.); sie wird durch ein Stück Gummischlauch mit der gefüllten Pipette verbunden.

D. Das *Schutzröhrchen* dient lediglich zur Verhütung des Einsaugens von Staub in die verengte Strecke der Aufsatzcapillare und dadurch bedingter Änderungen des Widerstandes: es wird lose mit Watte (6) ausgestopft und kann mit der Aufsatzcapillare dauernd durch ein Stück Gummischlauch verbunden bleiben.

[1]) Angefertigt bei Bleckmann & Burger, Glasbläserei, Berlin N 24, Auguststraße 3a.

Eine *Bestimmung* der Blutgerinnung erfolgt auf folgende Weise:

Aus einer Vene, die nur ganz kurze Zeit gestaut sein darf, werden in der üblichen Weise durch Rekordspritze etwa 5 ccm Blut entnommen, dabei die Zeit des Beginns und des Endes des Übertritts von Blut in die Spritze vermerkt; die Mitte zwischen beiden wird als Anfangspunkt für die „Gerinnungszeit" notiert. Aus der Spritze wird das Blut ohne Verzug in ein sauberes Porzellanschälchen entleert, daraus in die *trockene* und völlig saubere Tropfpipette aufgesogen, deren Hahn dann geschlossen wird.

Eine Verbesserung der Methodik, wenn auch keine unerläßliche, bedeutet es, wenn Spritze, Schälchen und Pipette auf 37° vorgewärmt sind.

Wer es für erforderlich hält, daß die Blutkörperchen aufgelöst werden, kann das Schälchen mit einer bekannten Menge destillierten Wassers beschicken und dann die gleiche, abgemessene Menge Blut hinzufügen. Wir selbst haben keinen Anlaß, von den Blutkörperchen Störungen zu befürchten.

Die gefüllte Tropfpipette wird bei geschlossenem Hahn in das Einsatzgefäß gesetzt, darauf in ein Wasserbad mit durchsichtigen Wänden getaucht; endlich wird auf die Pipette die Capillare nebst Schutzröhrchen gesetzt. — Die Temperatur des Wasserbades muß in allen Vergleichsversuchen *genau* die gleiche sein.

Als zweckmäßig haben wir früher 25 oder 30° empfohlen. Heute scheint uns eine *höhere* Temperatur, also 35 oder 37°, praktischer zu sein, weil dabei die Gerinnung *rascher* erfolgt, der Beobachter also weniger lange beansprucht ist.

Wenn der gefüllte und fertig zusammengestellte Apparat ruhig und senkrecht in dem Wasserbad steht, kann der Hahn geöffnet werden: man braucht sich damit nicht zu überhasten, der Zeitpunkt ist an sich gleichgültig, muß nur noch *vor* dem Eintritt der Gerinnung liegen. Erwartet man sehr langsame Gerinnung, so hält man den Hahn zweckmäßigerweise länger geschlossen oder schließt ihn vorübergehend wieder. Man beobachtet das Abtropfen des Blutes, das in regelmäßigen Intervallen von einigen Sekunden erfolgt. Werden die Intervalle länger, so verschärft man die Aufmerksamkeit, indem man den Fall jedes letzten Tropfens mit der bereitliegenden Uhr vergleicht; wenn eine Minute lang kein Tropfen mehr gefallen ist, so kann man abbrechen und den Augenblick des letzten Tropfenfalls als Endpunkt der Gerinnungszeit notieren. Die Ablesung kann mit Leichtigkeit auf 5 Sekunden genau gemacht werden.

Die Größe der Intervalle zwischen den einzelnen Tropfen hängt im wesentlichen von den Dimensionen der Aufsatzcapillare ab. Wir fanden es zweckmäßig, diese so zu wählen, daß während des ruhigen Tropfens etwa 8 Tropfen in der Minute fallen; dann verlängern sich die Intervalle gegen Ende gewöhnlich auf 15—20 Sekunden, so daß die ganze Bestimmung die Gerinnungszeit auf etwa $^1/_4$ Minute genau angibt. Dies ist 5% des Wertes bei einer mittleren Gerinnungszeit von 5 Minuten. In der Tat gehen in allen unseren Parallelbestimmungen am gleichen Blute die Abweichungen kaum über diesen Prozentsatz hinaus.

Die *Reinigung* des Apparats hat uns nie Schwierigkeiten bereitet, wenn sie auch Sorgfalt erfordert. Am besten wartet man nach Erledigung einer Bestimmung nicht lange, sondern benutzt die Zeit, während der das Koagulum noch weich und schlüpfrig ist: Man löst die Pipette von Einsatzgefäß und Aufsatzcapillare, zieht den Glashahn heraus, verschließt die Öffnungen des Hahnlagers mit den Fingern und saugt am oberen Ende der Pipette; dadurch zieht sich gewöhnlich der in dem engen Abtropfkanal der Pipette befindliche Teil des Gerinnsels in die Ampulle zurück; häufig kann nun — besonders mit Hilfe eines kräftigen Wasserstrahls — das Gerinnsel in toto durch die Hahnöffnung ausgespült werden; gelingt dies ausnahmsweise nicht, so muß es mit Hilfe eines Drahtes zerkleinert werden.

Nach der groben Reinigung wird die Pipette mit einer gesättigten Lösung von Chromsäure in konzentrierter Schwefelsäure gefüllt und mehrere Stunden, am besten über Nacht damit stehengelassen; sie entfernt alle am Glase etwa noch haftenden Fibrinreste. (Natürlich kann sie wiederholt gebraucht werden.) Die Säure wird mit reinem Wasser restlos ausgespült, jede Spur saurer Reaktion muß entfernt werden. Verdrängen des Wassers durch Alkohol erleichtert das Trocknen, das am bequemsten durch einen warmen Luftstrom geschieht.

Die Reinigung des Einsatzgefäßes braucht nur ästhetischen Ansprüchen zu genügen.

VIII.

Wir glauben, daß die von uns beschriebene Methode alles das bietet, was man von einer Bestimmung der „Gerinnungszeit" erwarten kann. Obwohl wir uns der ungenügenden wissenschaftlichen Bestimmtheit dieses Begriffs bewußt sind, scheint er uns noch immer die sicherste Handhabe zu bieten, die im strömenden Blute selbst gelegenen Bedingungen für ein „besseres" oder „schlechteres" Gerinnen quantitativ zu fassen. Daß ein Bedürfnis nach Messung der Gerinnungszeit vorliegt, beweisen die stets neu erdachten methodischen Vorschläge zu diesem Zwecke.

Zwei der Methoden, die im Laufe der letzten Jahre empfohlen wurden, nämlich die von *Bürker*[1]) und von *Werner Schultz*[2]), hat *Leineweber*[3]) nachgeprüft, ohne von den Ergebnissen befriedigt gewesen zu sein. Manche der bei der Methode von *Schultz* vorhandenen Schwierigkeiten dürften auch gegen die mit ihr verwandte Methode von *Fingerhut* und *Wintz*[4]) sprechen. Dagegen ist vor kurzem von *Frisch* und *Starlinger*[5])

[1]) Dtsch. med. Wochenschr. 1919, S. 433.
[2]) Berl. klin. Wochenschr. 1910, S. 527; Münch. med. Wochenschr. 1913, S. 4.
[3]) Vgl. Dissertation, zit. oben S. 466.
[4]) Münch. med. Wochenschr. 1914, S. 363.
[5]) Wien. klin. Wochenschr. 1921, S. 344.

ein Verfahren angegeben worden, das mit dem unseren das Prinzipielle gemeinsam hat: Die Beobachtung der *Tropffähigkeit* einer Blutsäule. Sie saugen das aus der Vene entnommene, in ein (paraffiniertes) Schälchen entleerte Blut in eine ziemlich enge Glasröhre, die von einem mit Wasser gefüllten Glasmantel umgeben ist und horizontal liegt; nur jede Minute wird sie einmal geneigt zur Probe, ob noch Blut ausfließt: der „*Anfang*" der Gerinnung ist an einem hängenbleibenden Fibrinfaden, das „*Ende*" am Ausbleiben des Ausfließens erkennbar. Die normale Gerinnungszeit beträgt dabei bei 20° Temperatur im Mantel 20 Minuten.

Die Genannten prüften auch die Methode von *Löwenthal*[1]) und fanden sie fehlerhaft.

Nach unseren eigenen Erfahrungen möchten wir der Methode von *Frisch* und *Starlinger* a priori Vertrauen schenken; sie hat vor der unseren die Vorteile der kleineren Blutmenge und billigeren Apparatur voraus. Dagegen haben wir die kürzere *Zeit* für die Ausführung der Bestimmung und vermutlich auch etwas engere Fehlergrenzen in die Wagschale zu werfen. Nicht ganz unbedenklich will es uns scheinen, daß bei *Frisch* und *Starlinger* gerade das *verjüngte Ende* des Rohres aus dem Wassermantel hervorragt und infolgedessen etwaigen Temperaturschwankungen der Zimmerluft ausgesetzt ist.

Erwünscht würde uns eine Prüfung der Methode von *Frisch* und *Starlinger* im *Doppel*versuch erscheinen, d. h. bei gleichzeitiger Blutentnahme aus *2* Venen desselben Menschen. Erst dann wird sich endgültig beurteilen lassen, ob jene Methode dieselbe Genauigkeit von 5% besitzt wie die unsere.

Gegen die soeben erst veröffentlichte Methode von *Wöhlisch*[2]) möchten wir geltend machen, daß der Autor selbst mit einem Fehler von 20% rechnet, daß sie viel zeitraubender ist und eine kostspieligere Apparatur erfordert als unsere Methode. Allerdings ist zuzugeben, daß nach *Wöhlisch* ein späterer Termin des gesamten Gerinnungsablaufs abgelesen wird, was zuweilen klinisch bedeutsam zu sein scheint.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode und ein Apparat beschrieben, die die Ermittlung der Blutgerinnungszeit in absolut zuverlässiger Weise mit einem Fehler von etwa 5% ermöglicht.

[1]) Dtsch. med. Wochenschr. 1914, S. 760.
[2]) Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. 27, 61. 1922.

Ein neues Stalagmometer und Stagonometer.

Berichtigung.

Von

I. Traube.

(Eingegangen am 30. März 1922.)

In Bd. *120* dieser Zeitschrift wurde ein neues Viscostalagmometer beschrieben, hergestellt nach dem Prinzip der Stalagmometer, indessen mit dem Unterschiede, daß die engere Capillarröhre im mittleren Teile des Apparates vermieden wurde und an Stelle derselben am oberen Ende des Apparates Capillarröhren ein- oder aufgeschliffen wurden von verschiedener Länge und Weite. Hierdurch wurde der erhebliche Vorteil erreicht, daß Verstopfungen nicht stattfinden können und derselbe Apparat für Flüssigkeiten verschiedenster Viscosität benutzt werden kann.

Es wurden nun auch nach demselben Prinzip Stagonometer hergestellt, welche den bisherigen Viscostagonometern entsprechen, indessen — und hier bedarf meine Veröffentlichung Bd. *120* dieser Zeitschrift einer Berichtigung — diese neueren Apparate sind nicht zur Bestimmung der Viscosität brauchbar, bieten aber bei Bestimmung der Oberflächenspannung erhebliche Vorteile, nur wolle man darauf achten, daß in die ein- oder aufgeschliffene Capillarröhre keine Flüssigkeit eintritt sowie vor allem auch keine Staubteilchen. Um den Flüssigkeitseintritt zu vermeiden, ist am oberen Teile des Apparats eine Erweiterung zu einer Kugel angebracht [1]).

[1]) Die Apparate sind zu beziehen von C. Gerhardt in Bonn.

Anwendung des Ultramikroskops für die Untersuchung der Wirkung von Giften auf die Zellen von Bakterien, Erythrocyten und Hefe.

Von

I. Traube und **P. Klein.**

(Eingegangen am 30. März 1922.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In einer Mitteilung, welche in dieser Zeitschrift **120**, 111. 1921, sowie ausführlicher in der Kolloid-Zeitschr. **29**, 236. 1921, von uns veröffentlicht wurde, wurde gezeigt, daß in konzentrierteren in erster Linie wässerigen Lösungen eine überaus große Zahl von Stoffen teilweise oder fast völlig kolloidal gelöst sind, von denen man es bisher nicht vermutete. Hierher gehören u. a. sämtliche beschränkt und schwerlöslichen Stoffe, so daß die Grenzen des Kolloidgebiets eine sehr erhebliche Erweiterung erfahren. Man hatte bisher übersehen, daß in den konzentrierteren Lösungen von Stoffen wie Amylalkohol, Buttersäure, Phenol, Anilin usw. zahlreiche Submikronen in lebhaftester *Brown*scher Bewegung vorhanden sind, und doch ist es so — konnten wir doch mit Hilfe des Ultramikroskops zeigen, daß diese Submikronen im Einklang mit *Gibbs* Prinzip sich an den Grenzflächen zweier Phasen oft derart anreichern, daß man ein Gewimmel kleiner Teilchen beobachtet, welche, wenn sie von der zweiten Phase nicht absorbiert wurden, oft noch nach 24 Stunden ihre lebhafte *Brown*sche Bewegung unverändert beibehielten[1]).

Interessante Films dieser *Gibbs*schen Anreicherung, welche auch die *Brown*sche Bewegung in vortrefflicher Weise zur Anschauung bringen, hatte Herr *Siedentopf* in Jena die große Liebenswürdigkeit, mit dem einen von uns, *P. Klein*, aufzunehmen, und sollen dieselben an anderer Stelle beschrieben werden.

Die Feststellung nun, daß zahlreiche Narkotica, Desinfizientien und andere pharmakologisch und toxikologisch wichtige Stoffe, von denen man es bisher nicht vermutete, in konzentrierten bzw. gesättigten Lösungen ultramikroskopisch sichtbar sind, dürfte nun für die Pharmakologie, Toxikologie, Bakteriologie, Befruchtungslehre und verwandte Wissenschaften von sehr erheblicher Bedeutung sein, insofern man

[1]) Vgl. die zitierte Abhandlung in der Kolloid-Zeitschr.

nun die Vorgänge, welche sich an der Grenze einer Zelle beim Einbringen in eine konzentrierte bzw. gesättigte Lösung obiger Stoffe abspielen, zum erheblichen Teil direkt beobachten und aus dem so bestimmten Verhalten der Submikronen des untersuchten Stoffes auch auf das Verhalten seiner Einzelmoleküle Rückschlüsse ziehen kann.

Die vorliegende kurze Mitteilung bezweckt nun, an einigen charakteristischen Beispielen zu zeigen, was auf diesem Wege erreichbar sein wird.

Versuche mit menschlichen Erythrocyten.

Das folgende mit Unterstützung von Herrn *Siedentopf* in Jena ultramikroskopisch aufgenommene Bild mag zeigen, was man u. a. ultramikroskopisch beobachten kann.

Das links befindliche photographische Bild zeigt die Blutkörperchen in isosmotischer Chlornatriumlösung. Rechts sieht man die Blutkörperchen in einer derartigen Lösung nach Zusatz einer gesättigten wässerigen

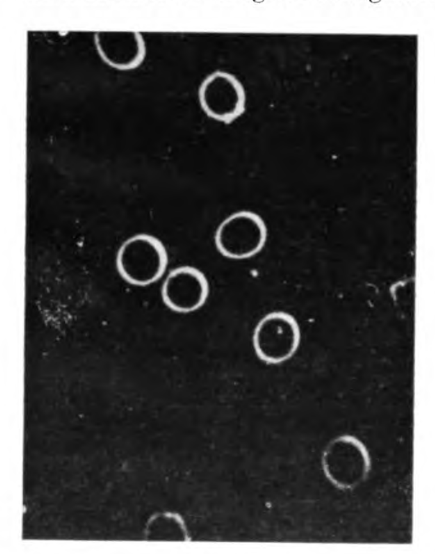


Abb. 1.

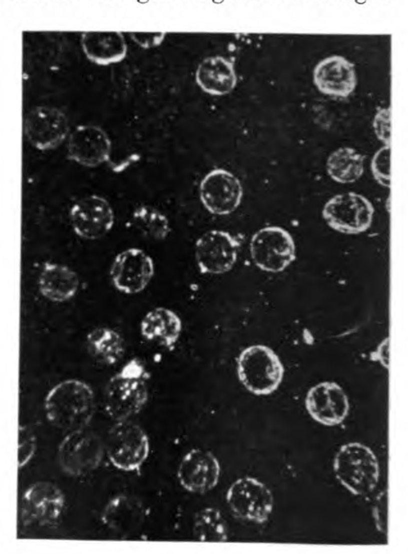


Abb. 2.

Xylidinlösung. Man beobachtet, wie die Xylidinsubmikronen allmählich in nicht sehr langer Zeit an den Oberflächen der Blutzellen adsorbiert werden, wie die vollbesetzten Blutkörperchen sich allmählich deformieren, wie die Xylidinsubmikronen vielfach in das Innere der Zellen eindringen, dort sich herumbewegen, dann beobachtet man den Ausfluß des Hämoglobins, und schließlich werden die Orte, wo die Stromata sich befinden, nur angezeigt durch etlichste Xylidinsubmikronen, die an denselben adsorbiert sind. Das wirklich beobachtete Bild ist noch wesentlich anschaulicher als das von der Photographie wiedergegebene.

Die Wirkung des Octylalkohols auf Erythrocyten war sehr ähnlich derjenigen des Xylidins. Vuzin wirkt noch wesentlich schneller hämolysierend als die eben genannten Gifte. Die Adsorption und das Eindringen der Submikronen erfolgte sehr schnell. Die Umrisse der Blutkörperchen wurden eckig.

Die Submikronen von Nonylsäure drangen weniger schnell in die Blutkörperchen ein, die Hämolyse verlief dementsprechend langsamer. Eine fast momentane Hämolyse und stärkste Adsorption sowie schnellstes Eindringen in die Blutkörperchen wurde bei Thymol beobachtet. Die Blutkörperchen erleiden eine baldige erhebliche Schrumpfung.

Ganz anders als die bisherigen Gifte wirkte m-Kresol. Eine Adsorption der Submikronen fand *nicht* statt. Die Blutkörperchen wurden unter Volumzunahme kugelförmig. Eine Hämolyse erfolgte nicht, wohl aber eine Flockung.

Versuche mit Bakterienzellen.

Von Bakterienzellen wählten wir, um bequem zu beobachten, einen größeren Bacillus, den *Soor*schen Bacillus, welchen uns gütigst Herr Dr. med. *Langer* im Kaiserin Augusta Viktoria-Haus, Charlottenburg, zur Verfügung stellte.

Xylidin wurde nach einiger Zeit adsorbiert, und es wurde wiederholt ein Platzen der mit Submikronen vollbesetzten Bacillen beobachtet. Vuzin, durch geringe Mengen Natriumcarbonat aus seinem Bichlorhydrat in Freiheit gesetzt, wurde auch hier sehr schnell adsorbiert; nach einiger Zeit erfolgten Deformationen, und alsdann platzten etliche Zellen. Auch Thymol wurde nach 10—15 Minuten voll adsorbiert. Die Umrisse wurden eckig, nach 30—45 Minuten trat eine Plasmolyse ein, auch wurde das Platzen von Zellen beobachtet. Selbst nach 30 Minuten nicht oder kaum adsorbiert im Gegensatz zu dem Verhalten der Blutkörperchen wurden Octylalkohol und Nonylsäure, aber adsorbiert wurde fast augenblicklich wiederum im Gegensatz zum Verhalten der roten Blutkörperchen m-Kresol. Es erfolgten nach etwa 10 Minuten starke Schrumpfungen der Zellen, die Umrisse wurden eckig, und es trat eine vollständige Plasmolyse ein.

Versuche mit Brennereireinhefe.

Die Reinhefe wurde uns gütigst von dem Institut für Gärungsgewerbe zur Verfügung gestellt.

Beim Einlegen in gesättigte Xylidinlösung waren die Zellen nach wenigen Minuten voll besetzt. Es wurden hier gelegentlich bei Adsorption von Submikronen Ausbuchtungen (Quellungshügel) beobachtet. Man sah, wie nach einiger Zeit die Zellen sich öffneten und das Plasma ausfloß. Die vom Plasma leeren Zellen waren aber nach längerer Zeit

vollbesetzt mit Xylidinsubmikronen. Octylalkohol wird etwas langsamer als Xylidin von der Zelle adsorbiert. Es erfolgte allmählich eine volle Besetzung; die Submikronen drangen in die Zellen ein, und man beobachtete die Bildung größerer blasenartiger Gebilde, deren Natur nicht festgestellt werden konnte. m-Kresol wurde gleichfalls allmählich adsorbiert. Es erfolgte eine Trübung des Plasmas, welche voraussichtlich auf Flockungsvorgänge zurückzuführen ist. Nicht sehr schnell wurde Thymol adsorbiert. Die Zellen öffneten sich, und Plasma floß aus. Nonylsäure wurde gleichfalls langsam adsorbiert; nach etwa 30 Minuten beobachtete man eine Anzahl vollbesetzter Zellen.

Die folgende Tabelle veranschaulicht die Geschwindigkeit der Adsorption bzw. die Nichtadsorption der genannten Gifte auf die 3 Zellarten. +++ bedeutet starke Adsorption momentan oder nach wenigen Minuten, ++ sowie + entsprechend langsamere Adsorption nach 15 Minuten oder länger, — keine Adsorption.

	Erythrocyten	*Soor*scher Bacillus	Hefezellen
Xylidin	++	++	+++
Vuzin (basisch)	+++	+++	
Octylalkohol	++	—(+)	++
Nonylsäure	+(++)	—	+
m-Kresol	—	+++	+
Thymol	+++	++	++(+)

Es sind weitere Versuche geplant, aber es wird gern begrüßt werden, wenn auch von anderer Seite Untersuchungen nach verwandten Richtungen ausgeführt werden. Das Ultramikroskop dürfte für die oben genannten Wissenschaften eine große Bedeutung erlangen.

Zusammenfassung.

In früheren Arbeiten wurde von uns gezeigt, daß beschränkt lösliche Substanzen in konzentrierten bzw. gesättigten wässerigen Lösungen mehr oder weniger kolloidal gelöst sind. Diese Lösungen enthalten daher im Ultramikroskop gut sichtbare Submikronen des gelösten Stoffes. Es konnte angenommen werden, daß diese Submikronen sich in vieler Beziehung geradeso verhalten wie die einzelnen Moleküle selbst. Obige Feststellung ermöglicht daher eine nähere Untersuchung der Wirkung von Giften auf Zellen mit Hilfe des Ultramikroskops.

Bei unseren vorläufigen Versuchen wurde die Einwirkung von Xylidin, Vuzin, Octylalkohol, Nonylsäure, m-Kresol und Thymol auf Erythrocyten, *Soor*sche Bacillen und Hefezellen nach dem obigen Prinzip ultramikroskopisch verfolgt.

Es wurde auf die Bedeutung derartiger ultramikroskopischer Beobachtungen für die Pharmakologie, Toxikologie, Befruchtungslehre usw. hingewiesen.

Löslichkeit, Capillaraktivität und hämolytische Wirksamkeit bei Terpenderivaten.

Von

Heinrich Rhode.

(Pharmakologisches Institut Göttingen.)

(Eingegangen am 31. März 1922.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Den Ausgangspunkt der folgenden Untersuchungen bildete eine Bemerkung von *J. Traube*[1]), die zunächst zur Deutung von Versuchsergebnissen *Ishizakas*[2]) ausgesprochen war, die aber auf eine Frage von allgemeinerem Interesse hinwies.

Ishizaka hatte beim Vergleich einer Reihe von Terpenketonen und Terpenalkoholen im Göttinger Pharmakologischen Institut ermittelt, daß sich gesetzmäßige Beziehungen zwischen ihrer Wirkung auf rote Blutkörperchen und auf die Oberflächenspannung des Wassers nur in einem beschränkten Umfang, nämlich bei sehr ähnlich gebauten Verbindungen, aufzeigen ließen; die Abweichungen von der Gesetzmäßigkeit gingen nach 2 Richtungen, insofern die Aufhebung sämtlicher Doppelbindungen im Molekül (Menthol, Borneol) mit einer Abschwächung, Anhäufung von 3 Doppelbindungen (Carvon und besonders Thymol) mit einer Verstärkung der hämolytischen Wirksamkeit im Verhältnis zur Capillaraktivität einherging. Aus diesen Ergebnissen hatte *Ishizaka* den Schluß gezogen, daß für die hämolytische Wirksamkeit der Substanzen „die Bedeutung rein physikalischer Momente durchaus unverkennbar, außerdem aber ein sehr erheblicher Einfluß der chemischen Natur zu bemerken sei“.

Traube hebt nun hervor, daß bei den besonders stark abweichenden Alkoholen Menthol und Borneol, wie auch bei dem etwas weniger herausfallenden Campher noch eine weitere *physikalische* Eigenschaft zu beachten sei, nämlich ihr fester Aggregatzustand bei der Versuchstemperatur im Gegensatz zu den mit ihnen verglichenen *flüssigen*

[1]) Diese Zeitschr. **98**, 177, 184. 1919.

[2]) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **75**, 194. 1914.

Ketonen, die sich gesetzmäßig verhielten. Er verweist auf eine Feststellung von *Devaux*, nach der feste Stoffe *auch in Lösungen* sich in der Oberfläche anders verhalten sollen wie flüssige, indem sie der Oberfläche eine etwas *starrere* Beschaffenheit verleihen; wegen dieser Veränderung erscheint die Oberflächenaktivität bei den festen Stoffen relativ größer als bei den flüssigen; werde dieser Faktor in Rechnung gesetzt, so würden auch die obengenannten, in ihrem Verhalten abweichenden Stoffe sich in die Regel einordnen lassen, die bei den meisten flüssigen Ketonen galt.

Die Vermutung *Traubes* konnte geprüft werden, wenn mit der gleichen Methodik, wie sie *Ishizaka* anwandte, ein Vergleich der früher studierten Substanzen mit solchen Terpenalkoholen oder -ketonen angestellt wurde, die innerhalb des für Hämolyseversuche brauchbaren Temperaturbereichs (von 10—40°) *sowohl fest wie flüssig* auftreten können. Solche Stoffe sind α- und β-Terpineol, die bei 35 und 32° schmelzen.

Traf die Vermutung von *Traube* zu, so mußte erwartet werden, daß oberhalb 35° die hämolytische Wirksamkeit der Terpineole zu ihrer Capillaraktivität im gleichen Verhältnis stünde wie bei den meisten flüssigen Ketonen der Menthon- und Carvonreihe, daß aber bei niedrigerer Temperatur entsprechende Abweichungen wie bei Menthol und Borneol auftreten.

Unter dem gleichen Gesichtspunkt wurde zu den Versuchen der *Norcampher* herangezogen, d. h. dasjenige Keton, das durch Absprengen der Methylgruppe vom Ring aus Campher entsteht. Da dieses Keton flüssig ist, aber in seinem chemischen Bau dem Campher ähnlicher als die Ketone der Menthon- und Carvonreihe, war es von Interesse, nachzuforschen, ob es sich in seiner hämolytischen Wirksamkeit der obengenannten Gesetzmäßigkeit fügte — wie nach *Traube* erwartet werden sollte — oder ob es ähnliche Abweichungen wie Campher aufwies.

Methodik.

a) Reinigung.

Auf möglichst vollkommene *Reinheit* der untersuchten Substanzen wurde größter Wert gelegt.

Zum Vergleich mit den neu herangezogenen Stoffen dienten racemischer Campher, Borneol, l-Menthon und Menthol; die festen Substanzen wurden durch Umkrystallisieren von bereits sehr reinen Handelspräparaten und Destillation des Endproduktes, das Menthon durch Umkrystallisieren seines Semicarbazons noch besonders gereinigt; das Semicarbazon wurde durch Einwirkung von Oxalsäure und Wasserdampf gespalten, das Menthon abgetrieben und im Destillat *ohne* Verwendung eines organischen Lösungsmittels vom Wasser getrennt, mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum (bei 12 mm Hg) destilliert.

Der Norcampher stammte von der Firma Friedr. Bayer & Co. in Elberfeld und destillierte restlos bei dem konstanten Siedepunkt von 216°. Die Terpineol-

präparate wurden von Schimmel & Co. in Leipzig-Miltitz[1]) geliefert; von ihnen waren zwei, α- und β-Terpineol, optisch inaktiv, das dritte (α-Terpineol) enthielt einen Überschuß der linksdrehenden Komponente entsprechend einer Aktivität von $\alpha_D = -4^1/_2°$. Der Schmelzpunkt der α-Terpineole wurde zu 34°, der des β-Terpineols zu 31° (unkorr.) gefunden; bei der Destillation zeigten die erstgenannten den konstanten Siedepunkt von 214° (Barometerdruck 745 mm Hg), während β-Terpineol *fast* restlos bei 212° überging; nur dieser Anteil wurde weiter verwertet. Alle 3 Präparate wurden endlich noch im Vakuum destilliert, doch wichen die Endprodukte kaum von den Ausgangssubstanzen ab, die eben bereits recht rein waren.

b) Löslichkeit und Capillaraktivität.

Mit allen gereinigten Substanzen wurden Bestimmungen der *Löslichkeit* und der *Oberflächenaktivität* in Wasser (d. h. Ringerlösung) vorgenommen. Die Methode war dabei die bereits von *Ishizaka*[2]) verwendete, die sich auch mir vortrefflich bewährte: Es wurden stalagmometrische Messungen der gesättigten Lösung und ihrer Verdünnungen ausgeführt, daneben in einer Parallelreihe ebensolche Bestimmungen an verschiedenen Konzentrationen *bekannten* Gehaltes; die erhaltenen Zahlen liefern das Maß der Oberflächenaktivität, daneben aber auch einen recht gut definierten Wert für die Sättigungskonzentration.

Es soll nicht verkannt werden, daß streng physikalisch bei derartigen Substanzen die „Löslichkeit" ein etwas unsauberer Begriff ist, weil echte molekulare und kolloidale Verteilung ineinanderfließen[3]). Trotzdem ist die „Löslichkeit" praktisch wichtig und unterscheidet sich bei verschiedenen Substanzen so beträchtlich, daß Zahlenangaben wohl ihren guten Sinn haben.

Daß mit dieser Einschränkung die Bestimmung der Löslichkeit nach *Ishizaka* sehr Gutes leistet, verdient um so mehr hervorgehoben zu werden, als seine Bestimmungen wenig beachtet zu werden scheinen. 5 Jahre später als *Ishizaka* haben *Leo* und *Rimbach*[4]) Untersuchungen über die Löslichkeit des *Camphers* mitgeteilt, in denen mit einer polarimetrischen Methode der Wert von 0,173, mit einer chemischen Methode der Wert von 0,167% gefunden wurde. *Ishizaka* hatte bei einer Schwankungsbreite von 0,167 bis 0,173 den Mittelwert von 0,170% ermittelt[5]).

Diese Übereinstimmung hätte wohl schon aus sachlichen Gründen Erwähnung verdient, obwohl oder gerade weil *Ishizaka* racemischen Campher benutzte, *Leo* und *Rimbach* dagegen aktiven.

Die von *Ishizaka* bereits untersuchten Substanzen, Campher, Borneol, Menthon und Menthol habe ich stalagmometrisch erneut durchgeprüft und dabei *genaue* Übereinstimmung mit seinen Ergebnissen beobachtet; diese Zahlen sind daher nicht nochmals aufgeführt. Aber auch diese Befunde bezeugen die Zuverlässigkeit der angegebenen Methode.

Schwankungen der Zimmertemperatur stören bekanntlich stalagmometrische Messungen kaum[6]); ich fand in meinem Apparate für Ringerlösung bei 15—20°

---

[1]) Beiden Firmen sei für ihre bereitwillige Unterstützung aufs beste gedankt.
[2]) Aepp. **75**, 194, 197ff. 1914.
[3]) Vgl. dazu *J. Traube* und *P. Klein*, diese Zeitschr. **119**, 111. 1921.
[4]) Diese Zeitschr. **95**, 306. 1919.
[5]) a. a. O. S. 219.
[6]) Vgl. *v. Issekutz*, diese Zeitschr. **88**, 213. 1918.

die Tropfenzahl 56, bei 30° 57, bei 50° 58. Auch die Flüchtigkeit der verwendeten Substanzen bedingt keinen merklichen Fehler: Nach 3 maligem Passieren des Stalagmometers fand ich im allgemeinen Verluste, die einer Differenz von 1,2 Tropfen entsprachen, während die Abweichung vom reinen Lösungsmittel 9—24 Tropfen betrug; nur bei Menthol stieg das Defizit auf 1,6 Tropfen (von insgesamt 25 Tropfen Differenz), bei Menthon sogar auf 3,8 Tropfen bei 22 Tropfen Differenz — doch erst nach *dreimaligem* Abtropfen der *gesättigten* Lösung.

Etwas Schwierigkeiten bereitete zuweilen die *Herstellung* der Lösungen, besonders der gesättigten. Oft war stunden- ja tagelanges Schütteln auf der Maschine erforderlich, um Sättigung herbeizuführen; die Kontrolle der erreichten Sättigung erfolgte wiederum stalagmometrisch: Blieb die Tropfenzahl bei fortgesetztem Schütteln konstant, so wurde keine weitere Substanz aufgenommen. Relativ leicht lösten sich Menthol und die Terpineole, diese besonders nach Erwärmung über den Schmelzpunkt vor Beginn des Schüttelns; wesentlich schwerer gingen Campher und Menthon, am allerschwersten Borneol in Lösung. Manche der erhaltenen gesättigten Lösungen, besonders der Terpineole und des Norcamphers zeigten eine leichte Opalescenz; beim Norcampher blieb sie in hohen Konzentrationen beständig und machte erst unterhalb 0,7‰ voller Klarheit Platz. In den gesättigten Terpineollösungen setzte sich jedoch der Überschuß allmählich in Schlieren, Tröpfchen oder Kryställchen ab, so daß schließlich saubere und klare Lösungen erhalten wurden; verdünntere Lösungen waren von vornherein klar.

Die Stalagmometer- und Hämolysezahlen beziehen sich stets auf Lösungen, die nach hinreichender (1/2—2tägiger) Berührung der Substanzen mit dem Lösungsmittel erhalten waren; für kürzere Zeiträume bleiben die Konstanten der Lösungen unverändert, wie ausdrücklich geprüft wurde. Nach mehreren Wochen allerdings waren Veränderungen an solchen Lösungen wahrzunehmen, die noch in Berührung mit „Bodenkörper" geblieben waren: Die Oberflächenspannung hatte noch etwas mehr abgenommen.

Über einen gewissen Grad hinaus ging freilich diese nachträgliche Erniedrigung der Oberflächenspannung nicht (z. B. bei α-Terpineol bis $\sigma_w - \sigma_l = 0{,}412$, d. h. 3% über den vorher bestimmten Sättigungswert hinaus — entsprechend einer Zunahme der Tropfenzahl von 93 auf 95). Am stärksten war sie bei Norcampher, dessen gesättigte Lösung nach einem halben Jahre eine Vermehrung der Tropfenzahl um 9 aufwies; dabei war die Opalescenz der Lösung kaum verändert, sicher nicht stärker geworden.

Die Deutung dieser Erscheinung ist nicht sicher; man könnte auf Grund der Befunde von *Traube* und *Klein*[1]) an eine nachträgliche Aufteilung kolloidal gelöster Partikel in kleinere und in Moleküle denken, wenn Zersetzungsvorgänge unter Bildung *stärker* capillaraktiver Stoffe mit Bestimmtheit auszuschließen wären.

---

[1]) Diese Zeitschr. **120**, 111; Kolloid-Zeitschr. **29**, 236. 1921.

c) Hämolyse.

Die Hauptzahl der Versuche wurde an gewaschenen Hammelblutkörperchen in Ringerlösung angestellt; nur diese finden sich im folgenden aufgezählt, obwohl einige Versuche mit gleichem Ergebnis auch an anderen Blutarten (Rind, Schwein, Kaninchen, Meerschweinchen) ausgeführt wurden.

Das Ziel der Versuche war nach dem Vorbild von *Ishizaka* die Ermittlung einer hämolytischen Grenzkonzentration bei gegebener Zeit und Temperatur. Durch das eingangs erörterte Problem wurden *zwei* Versuchsreihen bei verschiedener Temperatur gefordert; als geeignet wurde Brutschrank- und Zimmertemperatur gewählt, also rund 38 und 18°. Die Röhrchen blieben nach Mischung der Blutkörperchensuspension mit den gewünschten Konzentrationen der geprüften Substanzen *kontinuierlich* bis zur Ablesung *derselben* Temperatur stehen. Die Ablesung erfolgte zu verschiedenen Zeiten, in den endgültigen Versuchen aber bei Brutschranktemperatur nach 20—24 Stunden, und zwar zeitweise stündlich, selbst halbstündlich; bei Zimmertemperatur wurde die Beobachtung bis zu 3 Tagen ausgedehnt, die engere Eingrenzung der Werte aber durch häufigere Ablesung zwischen 24 und 40 Stunden versucht. Als *gleiche* Wirkung wurde der gleichzeitige Eintritt der ersten Hämolysegrade in den Parallelproben des Einzelversuchs gewertet.

Ergebnisse.

Die stalagmometrischen Messungen für α- und β-Terpineol sowie Norcampher sind auf Tabelle I—III zusammengestellt. Das optisch-aktive Präparat von α-Terpineol wurde genau so durchuntersucht, wie das inaktive, ergab aber durchweg die gleichen Werte, so daß diese nicht noch besonders aufgeführt sind.

Die in Spalte d jeder Tabelle *unter* dem Strich eingetragenen Werte wurden als Abszissen zur Zeichnung einer Kurve mit den Ordinaten der Spalte a (Zehntel der Sättigung) benutzt; auf dieser Kurve wurden die den Werten der Spalte d *über* dem Strich entsprechenden Zahlen — also ausgedrückt in Bruchteilen der Sättigungskonzentration — abgegriffen und aus ihnen unter Bezug auf die Werte für die angewandten Konzentrationen (Spalte a^1) die Sättigungskonzentration berechnet. Diese berechneten Werte finden sich in Spalte e.

Eine Darstellung der Wirkung auf die Oberflächenspannung bei verschiedenen Konzentrationen der 3 untersuchten Stoffe gibt die auf S. 487 stehende Kurventafel; der ausgezogene Teil der Kurven wurde unter Benutzung der *über* dem Strich, der gestrichelte Teil unter Benutzung der *unter* dem Strich stehenden Zahlen der Tabellen I—III gezeichnet.

Tabelle I.

α-Terpineol, $C_{10}H_{18}O$, F.-P. 35° (Tropfenzahl für Wasser 56,0).

a¹ Konzentration g im l	a² Konzentration Millimol	b Tropfenzahl	c σ_l	d $\sigma_w - \sigma_l$	e Sättigungskonzentration berechnet (g im l)
0,1	0,65	60,6	0,924	0,076	2,00
0,25	1,62	66,9	0,837	0,163	1,88
0,3	1,95	68,2	0,821	0,179	1,89
0,4	2,60	70,6	0,794	0,206	2,02
0,5	3,25	72,8	0,769	0,231	2,03
0,6	3,90	74,7	0,749	0,251	2,05
0,8	5,19	78,3	0,715	0,285	2,05
1,0	6,49	81,7	0,685	0,315	1,98
1,6	10,39	89,2	0,627	0,373	1,95
Zehntel der Sättigung					**1,98**
1		65,6	0,853	0,147	
2		70,6	0,794	0,206	
3		74,7	0,749	0,251	im Mittel
4		78,3	0,715	0,285	= 12,9 Millimol
5		81,7	0,685	0,315	
10		93,0	0,602	0,398	

Tabelle II.

β-Terpineol, F.-P. 32°.

a¹ Konzentration g im l	a² Konzentration Millimol	b Tropfenzahl	c σ_l	d $\sigma_w - \sigma_l$	e Sättigungskonzentration berechnet (g im l)
0,1	0,65	60,5	0,925	0,075	(2,51)
0,2	1,30	64,6	0,867	0,133	2,22
0,3	1,95	68,1	0,822	0,178	2,11
0,4	2,60	70,5	0,792	0,206	2,12
0,5	3,25	72,5	0,772	0,228	2,17
0,6	3,90	74,2	0,755	0,245	2,22
0,8	5,19	77,1	0,726	0,274	2,16
1,0	6,49	79,8	0,702	0,298	2,26
1,2	7,77	81,9	0,683	0,317	2,26
1,4	9,09	83,6	0,669	0,331	2,18
1,6	10,39	85,5	0,655	0,345	2,27
2,0	12,98	89,3	0,629	0,371	2,25
Zehntel der Sättigung					**2,20**
1		65,5	0,855	0,145	
2,5		73,4	0,762	0,233	
3		75,2	0,745	0,255	im Mittel
4		78,4	0,714	0,286	= 14,3 Millimol
5		80,9	0,692	0,308	
10		90,8	0,616	0,384	

Tabelle III.

Norcampher $C_9H_{14}O$.

a[1] Konzentration g im l	a[2] Millimol	b Tropfenzahl	c σ_l	d $\sigma_w - \sigma_l$	e Sättigungskonzentration berechnet (g im l)
0,1	0,72	57,0	0,982	0,018	(2,50)
0,2	1,45	58,5	0,957	0,043	1,91
0,3	2,17	59,6	0,939	0,061	1,93
0,4	2,89	60,7	0,922	0,078	1,95
0,5	3,62	61,8	0,906	0,094	1,94
0,6	4,35	62,9	0,890	0,110	1,94
0,7	5,07	64,0	0,875	0,125	1,94
0,8	5,79	65,1	0,860	0,140	1,93
0,9	6,52	66,1	0,847	0,153	1,94
1,0	7,24	67,2	0,833	0,167	1,91
Zehntel der Sättigung					**1,93**
1		58,3	0,958	0,042	
2		60,5	0,925	0,075	
3		62,6	0,894	0,106	im Mittel
4		64,7	0,865	0,135	= 14,0 Millimol
5		66,7	0,839	0,161	
10		75,5	0,741	0,259	

Hält man die gefundenen Konstanten mit den von *Ishizaka* ermittelten und von mir bestätigten Werten für die übrigen von mir gebrauchten Stoffe zusammen, so ergibt sich die Übersichtstabelle IV.

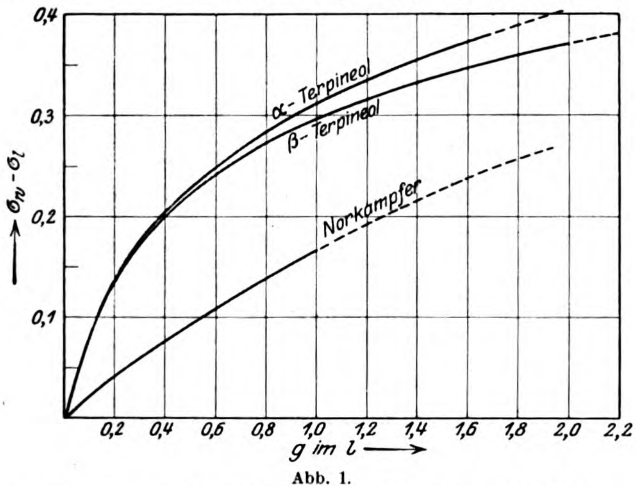


Abb. 1.

Die Hämolyseversuche sind auf den Tabellen V—XIV zusammengestellt, wobei jede Nummer die mit *einer* Blutprobe gleichzeitig angesetzten Versuche umfaßt. Als Lösungsmittel der Substanzen, wie zum Waschen und Aufschwemmen der Blutkörperchen diente eine Lösung von 0,85% NaCl, 0,03% KCl und 0,02% $CaCl_2$; die Suspension

Tabelle IV.

Substanz	Formel	Löslichkeit im Liter g	Löslichkeit im Liter Millimol	$\sigma_w - \sigma_l$ bei 2 Millimol im Liter	$\sigma_w - \sigma_l$ in der Sättigung
β-Terpineol . . .	HO	2,20	14,3	0,17	0,38
α-Terpineol . .	OH	1,98	12,9	0,18	0,40
Norcampher . .	O	1,93	14,0	0,05	0,26
Campher	O	1,70	11,2	0,10	0,29
Menthon	O	0,69	4,5	0,18	0,28
Borneol	HO	0,64	4,2	0,22	0,30
Menthol	OH	0,42	2,7	0,31	0,35

der Blutkörperchen war 10fach verdünnt, davon wurde jedesmal 0,5 ccm zu 5 ccm der zu untersuchenden Lösung zugesetzt. Die angegebenen Konzentrationen bedeuten die in der fertigen *Mischung* vorhandenen.

Der *Grad* der beobachteten Hämolyse ist in Zahlen ausgedrückt, von denen bedeutet:

0: keine Hämolyse,
1: beginnende Hämolyse eben erkennbar,
2: deutliche, doch mäßige Hämolyse,
3: starke, doch unvollst. Hämolyse,
4: fast vollkommene Hämolyse,
5: totale klare Lösung.

a) Versuche bei 38° (Tabellen V—IX).

Tabelle V. Versuch 1; 38°.

Substanz	‰	nach Stunden ½	1	4	‰	nach Stunden 8	16	18	‰	nach Stunden 20	24	28	‰	nach Stunden 28	49	6…
i-α-Terpineol .	2,0	0	5	—	1,0	0	5	—	0,5	0	3	5	0,25	1	2	4
	1,88	0	5	—	0,94	0	5	—	0,47	0	2	4	—	—	—	—
l-α-Terpineol .	2,0	0	5	—	1,0	0	5	—	0,5	0	3	5	0,47	4—5	5	—
	1,88	0	5	—	0,94	0	5	—	0,47	0	2	4—5	0,25	1	2	4—5
β-Terpineol . .	2,0	0	5	—	1,0	0	4	5	0,5	0	2	5	0,47	2	5	
	1,88	0	3—4	5	0,94	0	3	5	0,47	0	1	2	0,25	1	2	3—4
Norcampher . .	—	—	—	—	1,5	0	0	1	1,3	0	1	—	0,8	—	0—1	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	1,0	0	0	0—1	0,4	—	0	0—1
Campher . . .	—	—	—	—	0,9	0	1	2	0,80	0	0	1	0,75	0—1	2	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	0,75	0	0	0—1	0,70	0—1	1—2	5
Menthon . . .	0,45	0	0	1—2	0,45	3	—	—	0,40	3	—	—	—	—	—	
	0,40	0	0	0	0,40	1	1—2	2	—	—	—	—	—	—	—	—
Borneol . . .	—	—	—	—	0,40	0	1	2	0,34	0	1	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	0,30	0	0	2	—	—	—	—
Menthol . . .	—	—	—	—	0,18	0	0—1	1	0,15	0	1	—	0,12	1	2	5
	—	—	—	—	—	—	—	—	0,12	0	0	1	—	—	—	—

Tabelle VI.

Versuch 2; 38°.

Substanz	‰	nach Stunden 6	12	18	24	‰	nach Stunden 12	18	24	‰	nach Stunden 18	24	30
·α-Terpineol. .	0,7	0	0—1	2—3	4—5	0,5	0	0	4	0,3	0	0	1
-α-Terpineol. .	0,7	0	0—1	2—3	4—5	0,5	0	0—1	4	0,3	0	0	2
-Terpineol . .	0,7	0	0	2	4	0,5	0	0	4	0,3	0	0	1
Norcampher . .	1,7	0	0	2	3	1,5	0	2	3	1,3	0	1	2
Campher . . .	0,90	0	0	1	2	0,85	0	0	1	0,80	0	0	2
Menthon . . .	0,35	0	0	1	2	0,30	0	0	1	0,25	0	0	4
Borneol	0,40	0	0	2	5	0,34	0	0	1	0,30	0	0	1
Menthol. . . .	0,20	0	0	2	2	0,15	0	0	1	0,10	0	0	2

Versuch 3; 38°.

Substanz	‰	6	12	18	24	‰	12	18	24	‰	18	24	30
-α-Terpineol. .	0,8	0	0—1	1—2	5	0,6	0	0	4	0,4	0	0	1
-α-Terpineol. .	0,8	0	0—1	1—2	5	0,6	0	0	4	0,4	0	0	1
β-Terpineol . .	0,8	0	0	1	5	0,6	0	0	3	0,4	0	0	0—1
Norcampher . .	1,5	0	0	2	4	1,4	0	1	3—4	1,3	0	1	2
Menthon. . . .	0,3	0	0	0	1	—	Campher			0,85	0	1	2

Tabelle VII.

Versuch 4; 38°.

Substanz	‰	nach Stunden 16	18	20	22	‰	nach Stunden 20	22	24	‰	nach Stunden 24	30
i-α-Terpineol .	0,6	0	1—2	2	3—4	0,5	0	1	2	0,4	0	2
l-α-Terpineol .	0,6	0	1—2	2	3—4	0,5	0	1	2	0,4	0	2
β-Terpineol . .	0,6	0	1	2	3	0,5	0	1	2	0,4	0	1—2
Norcampher . .	1,40	0	1	2	2	1,35	0	1	2	1,20	0	1
Menthol . . .	0,36	0	0	1—2	2	0,34	0	0	1	0,32	0	2

Versuch 5; 38°.

Substanz	‰	16	18	20	22	‰	20	22	24	‰	24	30
i-α-Terpineol .	0,50	0	0	0—1	1	0,45	0	1	2	0,40	0	2
l-α-Terpineol .	0,50	0	0	0—1	1	0,45	0	1	2	0,40	0	2
β-Terpineol . .	0,50	0	0	0	0—1	0,45	0	0	1	0,40	0	1—2

Tabelle VIII.

Versuch 6; 38°.

Substanz	‰	nach Stunden 12	19	22	24	‰	nach Stunden 19	22	24	‰	nach Stunden 19	22	24
i-α-Terpineol .	0,48	0	0—1	1—2	2	0,45	0	1	2	0,42	0	0—1	1
l-α-Terpineol .	0,48	0	0—1	1—2	2	0,45	0	1	2	0,42	0	0—1	1
β-Terpineol . .	0,40	0	0	0—1	1—2	0,45	0	0	1	0,42	0	0	0
Borneol. . . .	0,34	0	0	0	1	0,32	0	0	0	—	—		—
Menthol . . .	0,15	0	0	0	1	0,12	0	1	0	—			—

Tabelle IX.

Versuch 7; 38°.

Substanz	‰	nach Stunden 21	22	23	24	‰	nach Stunden 22	23	24	‰	nach Stunden 23	24	30
i-α-Terpineol .	0,45	0	0	1	2	0,44	0	0—1	1	0,43	0	1	–
l-α-Terpineol .	0,45	0	0	1	2	0,44	0	0—1	1	0,43	0	1	–
β-Terpineol . .	0,45	0	0	0	1	0,44	0	0	0	0,43	0	0	—
Norcampher . .	1,35	0	1	1	2	1,32	0	1	2	1,25	0	0—1	–
Borneol	0,34	0	0	0	1	—	Menthol			1,15	0	1	–
Versuch 8; 38°.													
i-α-Terpineol .	0,43	0	0	0	1	0,42	0	0	0—1	0,41	0	0	2
l-α-Terpineol .	0,43	0	0	0	1	0,42	0	0	0—1	0,41	0	0	2
β-Terpineol . .	0,43	0	0	0	0	0,42	0	0	0	0,41	0	0	1
Norcampher . .	1,30	0	0	0	1	1,28	0	0	0	1,25	0	0	2
Campher . . .	0,85	0	0	0	1	—	Menthon			0,30	0	1	-
Versuch 9; 38°.													
i-α-Terpineol .	0,45	0	0	1	2	0,43	0	0	1	0,40	0	0	2
l-α-Terpineol .	0,45	0	0	1	2	0,43	0	0	1	0,40	0	0	2
β-Terpineol . .	0,45	0	0	0	1	0,43	0	0	0	0,40	0	0	1
Norcampher . .	1,33	0	1	1	2	—	Borneol			0,34	0	1	–
Campfer . . .	0,18	1	2	2	2—3	0,15	0	0	1	—	—	—	—
Versuch 10; 38°.													
i-α-Terpineol .	0,45	0	0	1	2	0,43	0	0	1	0,40	0	0	2
l-α-Terpineol .	0,45	0	0	1	2	0,43	0	0	1	0,40	0	0	2
β-Terpineol . .	0,45	0	0	0	1	0,43	0	0	0	0,40	0	0	1
Norcampher . .	1,33	0	0	1	2	1,30	0	0	1	1,28	0	0	–
Campher . . .	0,85	0	0	0	1	—	Borneol			0,34	0	1	-
Menthon . . .	0,30	0	0	0	1	—	Menthol			0,15	0	1	—

b) Versuche bei Zimmertemperatur (Tabellen X—XIV).

Tabelle X.

Versuch 11; Zimmertemperatur. Blutkörperchen bereits 2 Tage alt.

Substanz	‰	nach Stunden 24	30	‰	nach Stunden 24	30	‰	nach Stunden 30	50
i-α-Terpineol .	0,5	2	2	0,4	1	2	0,3	0	3
l-α-Terpineol .	0,5	2	2	0,4	1	2	0,3	0	3
β-Terpineol . .	0,5	1–2	2	0,4	0–1	1	0,3	0	2
Norcampher . .	1,6	2	2	1,3	1	1	—	—	—
Campher . . .	1,00	1	2	0,85	1	3	—	—	—
Menthon . . .	0,50	1	3	0,30	1	3	—	—	—
Borneol . . .	0,38	0	1	0,34	1	2	—	—	—
Menthol . . .	0,18	0	1	0,15	1	2	—	—	—

Tabelle XI.

Versuch 12; Zimmertemperatur.

Substanz	‰	nach Stunden			‰	nach Stunden		‰	nach Stunden	
		26	36	72		36	72		36	72
i-α-Terpineol .	0,8	0	0	4	0,6	0	2	0,4	0	0—1
l-α-Terpineol .	0,8	0	0	4	0,6	0	2—3	0,4	0	0—1
β-Terpineol . .	0,8	0	0	3	0,6	0	2	0,4	0	0
Norcampher . .	1,8	0	0	5	1,0	0	0—1	—	—	—
Borneol . . .	0,6	0	0	4	0,45	0	2	0,34	0	1
Menthol . . .	0,3	0	0	5	0,24	0	2	0,15	0	1

Tabelle XII.

Versuch 13; Zimmertemperatur.

Substanz	‰	nach Std.					‰	nach Std.				‰	n. Std.			‰	nach Std.			‰	n. Std.	
		12	18	22	24	36		18	22	24	36		24	36	46		24	36	46		36	46
-α-Terpineol	1,00	0	1	2	3	5	0,94	1	2	3	5	0,5	0	2	3	0,47	0	1—2	3	0,25	0	2
-α-Terpineol	1,00	0	1	2	3	5	0,94	1	2	3	5	0,5	0	2	3	0,47	0	1—2	3	0,25	0	2
-Terpineol .	1,00	0	1	1—2	2—3	5	0,94	0	1—2	2	5	0,5	0	1	2	0,47	0	0—1	2	0,25	0	1
ampher . .	1,05	0	1	2	3	4	—	—	—	—	—	1,05	3	4	5	0,85	0	1	—	—	—	—
enthon . .	0,50	0	0	1	2	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,33	0	1	—	—	—	—
orneol . .	0,60	0	0	2	3	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,34	0	1	—	—	—	—
enthol . .	0,32	0	1	2	3	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,15	0	1	—	—	—	—

Tabelle XIII.

Versuch 14; Zimmertemperatur.

Substanz	‰	nach Stunden					‰	nach Stunden			‰	nach Std.	
		10	25	27	38	40		25	27	34		27	32
i-α-Terpineol . .	1,20	0	1	2	—	—	1,00	0	1	—	0,95	0—1	2
l-α-Terpineol . .	1,20	0	1	2	—	—	1,00	0	1	—	0,95	0—1	2
β-Terpineol . .	1,20	0	0	1—2	—	—	1,00	0	0	—	0,95	0	2
Campher . . .	—	—	—	—	—	—	1,60	0	0	1	0,85	0	1
Menthon . . .	0,43	0	0	0	4	5	0,37	0	0	1	0,30	0	0
Borneol . . .	0,45	0	0	0	1	2	—	—	—	—	—	—	—
Menthol . . .	—	—	—	—	—	—	0,35	0	1	2	—	—	—

Tabelle XIV.

Versuch 15; Zimmertemperatur.

Substanz	‰	nach Std.			‰	nach Stunden			‰	nach Stunden			‰	n. Std.	
		20	32	34		20	32	34		32	34	40		38	40
i-α-Terpineol .	0,66	0	1	2	0,60	0	0	1	0,57	0	0	2	0,43	0	1
l-α-Terpineol .	0,66	0	1	2	0,60	0	0	1	0,57	0	0	2	0,43	0	1
β-Terpineol . .	0,66	0	0	1	0,60	0	0	0	0,57	0	0	1—2	0,45	0	1
Norcampher . .					1,58	0	0	1	1,45	0	0	2	1,30	0	1
Campher . . .					1,10	0	0	1	1,00	0	0	2	0,85	0	1
Menthon . . .					0,43	0	1	2	0,37	0	1	2	0,30	0	1
Borneol. . . .					0,50	0	1—2	3	0,45	0	1	2	0,34	0	1
Menthol. . . .					0,30	0	1—2	2	0,20	0	1	2	0,15	0	1

Die Zahlen der Tabellen V—IX grenzen die hämolytische Minimalkonzentration der untersuchten Stoffe für die gegebenen Bedingungen, nämlich 1% Blutkörperchen, 38° und 24 Stunden, scharf ein. Bei den bereits früher untersuchten Substanzen ist die Übereinstimmung mit *Ishizaka* ausgezeichnet, wie folgende Gegenüberstellung beweist:

	Ishizaka	*Rhode*
Campher	zwischen 0,82 und 0,91‰	0,85‰
Menthon	„ 0,27 „ 0,32 „	0,30 „
Borneol	„ 0,32 „ 0,36 „	0,34 „
Menthol	„ 0,14 „ 0,16 „	0,15 „

Die neu geprüften Substanzen lieferten unter gleichen Bedingungen die Zahlen:

α-Terpineol 0,43‰ = 2,8 Millimol im Liter
β-Terpineol 0,45 „ = 2,9 „ „ „
Norcampher 1,30 „ = 9,4 „ „ „

Die Beziehungen zwischen hämolytischer Grenzkonzentration, Capillaraktivität und Löslichkeit sind durch die Tabelle XV gegeben, in die auch einige Zahlen aus der Arbeit von *Ishizaka* nochmals aufgenommen wurden.

Tabelle XV.

Substanz	Hämolytische Grenzkonzentration g im l	Millimol	Löslichkeit im Wasser Millimole im l	$\sigma_w - \sigma_l$ in der hämolytischen Grenzkonzentration
Borneol	0,34	2,2	4,2	0,23
Menthol	0,15	1,0	2 7	0,23*)
α-Terpineol . .	0,43	2.8	12,9	0.215
β-Terpineol. . .	0,45	2,9	14,3	0,215
Norcampher . .	1,30	9,4	14,0	0,205
Campher. . . .	0,85	5,6	11,2	0,20
Menthenon . . .	0,60	4,0	15,1	0.18
Carvenon. . . .	0,58	3.8	14.5	0,18
Dihydrocarvon .	0,45	3,0	6,8	0,18
Menthon	0.30	2,0	4,5	0,18
Carvotanazeton .	0.34	2,2	5,8	0,17
Tetrahydrocarvon	0.25	1,6	3,9	0.17
Carvon.	0,50	3.3	8,8	0,15
Thymol	0,10	0.7	5,7	0,08

*) Die von *Ishizaka* angegebene Zahl 0,24 für Menthol ist falsch berechnet: seine eigenen experimentellen Daten liefern die Zahl 0,23.

Folgerungen.

Die Betrachtung der Tabelle lehrt, daß sich das Keton Norcampher und die Alkohole α- und β-Terpineol nach ihrem Einfluß auf die Oberflächenspannung einer wässerigen Salzlösung bezogen auf ihre hämolytische Wirksamkeit zwischen dem festen Keton Campher und den festen Alkoholen Borneol und Menthol einordnen, obwohl sie alle

drei bei 38° flüssig sind. Norcampher steht dabei näher an Campher, die Terpineole näher an den Alkoholen. Es sind also sichtlich Beziehungen erkennbar, die vorläufig der strukturchemischen Verwandtschaft näher verknüpft scheinen als den physikalischen Eigenschaften, soweit sie wenigstens durch Capillaraktivität, Löslichkeit und Schmelzpunkt gegeben sind.

Über die besondere Frage, ob ein oberhalb seines Schmelzpunkts gelöster Körper sich in der Lösung anders verhalten, insonderheit auch pharmakologisch anders wirken könne als unterhalb seines Schmelzpunktes[1]), liefert ein Vergleich der Versuche 1—10 mit den Versuchen 11—15 Aufschluß, die bei Zimmertemperatur, also weit unter dem Schmelzpunkt der Terpineole vorgenommen wurden. Für die quantitative Bewertung können auch hier nur solche Versuche in Frage kommen, bei denen der *Beginn* der Wirkung durch verschiedene Substanzen *gleichzeitig* ausgelöst wurde; dann hat man wiederum vergleichbare „Grenzkonzentrationen". Da der Faktor der *Zeit* bei den geprüften Substanzen recht bedeutsam ist, können nur Ablesungen in *kürzeren* Intervallen zu einem Urteil über annähernde „Gleichzeitigkeit" berechtigen; bei dem über Tage sich hinziehenden Verlauf der Vergiftung bis zum Eintritt sichtbarer Veränderungen ist diese Forderung nicht immer leicht erfüllbar und infolgedessen die Ausbeute der angegebenen Zahlen relativ gering.

Die hämolytische Grenzkonzentration bei Zimmertemperatur liegt nach dem Ausfall des Versuchs 13 (Tabelle XII) für frische Blutkörperchen und 24 Stunden zwischen der Grenzkonzentration bei 38° und dem doppelten Wert; die für 38° gültige Grenzkonzentration bewirkt bei Zimmertemperatur erst nach 40 Stunden Hämolysebeginn, wie Versuch 15 zeigt (Tabelle XIV). Innerhalb gewisser Grenzen scheinen Wirkungszeit und Konzentration annähernd umgekehrt proportional zu sein.

Im Versuch 15 ist es gelungen, innerhalb 2stündiger Ablesung bei allen Proben gemeinsam die Wirkungsgrenze zu fassen; die dabei angewandten Konzentrationen sind *genau* die gleichen wie bei 38° und 24 Stunden, d. h. das Wirkungsverhältnis ist für *alle* Substanzen dasselbe geblieben, auch für diejenigen, die bei dieser Temperatur einen anderen Aggregatzustand besitzen wie bei 38° (Terpineole).

Nicht anders ist das Ergebnis, wenn man andere Zeiten und Konzentrationen auswählt; am zweckmäßigsten bezieht man dann die Konzentrationen der verschiedenen angewandten Substanzen auf *eine* von ihnen als *Einheit*, z. B. auf Menthol oder Borneol als besonders stabile Verbindungen.

---

[1]) Vgl. oben S. 482.

Die wenigen für solche Berechnungen brauchbaren Zahlen finden sich in den Versuchen 14 und 15; setzt man die entsprechende Mentholkonzentration als Einheit, so ergeben sie die in Tabelle XVI verzeichneten Zahlen, die mit den bei 38° gefundenen gut übereinstimmen.

Tabelle XVI.

Verhältnis der hämolytischen Grenzkonzentrationen (in absolutem Gewicht). Menthol = 1.

Temperatur:	Zimmertemperatur			38°
Einwirkungszeit (Std.):	27	34	40	24
α-Terpineol . . .	2,9	3,0	2,9	2,9
β-Terpineol . . .	—	3,3	3,0	3,0
Campher	—	5,5	5,7	5,7
Menthon		1,9	2,0	2,0
Borneol	—	2,3	2,3	2,3

Das Ergebnis ist also völlig eindeutig: Die von *Traube* seinerzeit herangezogene Erklärung für diejenigen Befunde *Ishizakas*, die seinen theoretischen Ansichten widersprechen, ist *nicht stichhaltig*.

Denn wäre das der Fall, daß nämlich die „Reibung" in der Oberflächenschicht einer Lösung unterhalb des Schmelzpunkts des gelösten Stoffes größer wäre als oberhalb und daß *darauf* die Abweichung der Beziehung Capillaraktivität zu Wirkung bei den *festen* Terpenderivaten zurückzuführen wäre, dann müßte erwartet werden, daß die Terpineole bei 38° eine relative Abweichung der hämolytischen Wirksamkeit gegenüber Menthol und anderen festen Terpenderivaten zeigten; da größere Reibung nach *Traube* die Hämolyse erschwert, müßte eine relativ *niedrigere* Grenzkonzentration festzustellen sein. Das trifft aber nicht zu.

Nun hat *Traube* neuerdings — nachdem die geschilderten Experimente bereits abgeschlossen waren — anerkannt, daß die stalagmometrischen Messungen vielfach versagen, wenn man in ihnen Aufschluß über das Wesen pharmakologischer Wirkungen zu finden sucht, zugleich aber auch in wichtigen Versuchen gemeinsam mit *Klein*[1]) gezeigt, daß viele wässerige „Lösungen" organischer Substanzen den Hauptanteil *kolloidal* gelöst enthalten und dann der Einfluß auf die Oberflächenspannung des Lösungsmittels abgeschwächt ist oder fehlt, der nur durch hochdisperse Substanz ausgeübt wird. Dadurch ist eine Grundlage gegeben, die Frage erneut aufzuwerfen, ob pharmakologische Wirkungen, wie die narkotische oder hämolytische, ausschließlich von einer bestimmten physikalischen Eigenschaft abzuleiten sind (etwa dem „Haftdruck" Traubes), für die der Einfluß auf die Tropfengröße der Lösung nur ein Indicator ist. *Traube* meint, daß das durch andere Methoden erwiesene „Gibbs-positive" Verhalten jenen Indicator voll-

---

[1]) Diese Zeitschr. **120**, 111; Kolloid-Zeitschr. **29**, 236. 1921.

wertig vertreten könne. Es ist schwer, darüber zu urteilen und auf dem Wege des Experimentes eine Entscheidung zu suchen, solange keine schärferen quantitativen Methoden für diejenigen Fälle ausgearbeitet sind, bei denen für die Bestimmung des „Haftdrucks" die Capillaritätsmessungen versagen.

Unter den von *Traube* und *Klein* untersuchten Substanzen finden sich keine Terpenderivate. Am nächsten kommt ihnen das *Thymol*, für dessen *gesättigte* Lösung sie einen schwachen Tyndallkegel feststellten. Daß manche Erscheinungen bei der Herstellung gesättigter Lösungen von Terpenderivaten für eine partielle *kolloidale* Verteilung sprechen, wurde oben bereits geschildert (vgl. S. 484). Am schlagendsten prägte sich dies in der Opalescenz der höherkonzentrierten Lösungen des Norcamphers aus, der freilich auch unter allen gebrauchten Substanzen die geringste Garantie der absoluten Reinheit bot. Zu beachten bleibt aber, daß die Gegenwart kolloidaler Partikel in Krystalloidlösungen im allgemeinen stark abnimmt bei Verdünnungen, die weitab von der Sättigungskonzentration liegen; so geben auch *Traube* und *Klein* an, daß z. B. die ultramikroskopische Teilchenzahl in einer willkürlichen Raumeinheit von Lösungen des Amylalkohols mit der Verdünnung folgendermaßen abnimmt: Sättigung 300—500, $^3/_4$ Sättigung 200, $^1/_2$ Sättigung 15—20, $^1/_4$ Sättigung 2—4. Wenn man nun findet (vgl. Tabelle XV), daß die hämolytische Grenzkonzentration von Thymol etwa $^1/_8$ des β-Terpineols, $^1/_5$ der Sättigungskonzentration beträgt, deren Stalagmometerwerte aber sich wie 1 : 3 verhalten, so ist es a priori nicht ganz leicht, die Erklärung für einen solchen Unterschied restlos in Differenzen des Dispersitätsgrades zu suchen.

Immerhin dürfte es angebracht sein, endgültige Schlußfolgerungen aus den Zahlen der Tabelle XV zu vermeiden, solange nicht weitere Erfahrungen über die Dispersitätsverhältnisse in Lösungen der angewandten Substanzen, besonders bei der hämolytischen Grenzkonzentration, gewonnen sind.

Anhang.

Nicht ohne Interesse ist ein Nebenbefund, den ich mehrmals erhob: Wenn Kontrollblutproben neben solchen stehen blieben, in denen gleiche Blutkörperchensuspensionen einen *geringen* Zusatz eines Terpenderivates erhalten hatten, so hämolysierten diese oft *später* als die unbehandelten Proben. Dies ist wohl nicht oder wenigstens nicht allein auf eine antibakterielle Wirkung zurückzuführen, sondern stellt ein Analogon des von *Arrhenius* und *Bubanovicz*[1]) erhobenen Befundes dar, daß nämlich kleine Dosen hämolysierender Narkotica die Resistenz der Erythro-

[1]) Zit. nach *Höber*, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, 1914, 4. Aufl., S. 466.

cyten gegen Hämolyse durch Hypotonie steigern. In Versuchen von Prof. *Heubner* zeigte sich eine gleichartige Hemmungswirkung von Terpineol und ähnlichen Stoffen auch gegenüber der Saponinhämolyse.

Zusammenfassung.

1. Die Löslichkeit, Capillaraktivität und hämolytische Grenzkonzentration von Campher, Borneol, Menthon und Menthol wurde bestätigt, die von α- und β-Terpineol sowie Norcampher festgelegt.

2. Die erhaltenen Daten zeigen keinen gesetzmäßigen Zusammenhang zwischen den beiden physikalischen Konstanten und der hämolytischen Wirksamkeit. (Jedoch gilt dies nur unter Vorbehalt, da der etwaige kolloidale Anteil der gelösten Substanzen nicht berücksichtigt wurde.)

3. Die relative hämolytische Wirksamkeit einer Substanz ist die gleiche oberhalb wie unterhalb ihres Schmelzpunktes.

Über Fällungsreaktionen in Chlorophyll- und anderen Farbstofflösungen.

Von

M. Eisler und L. Portheim.

[Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institut und der Biologischen Versuchsanstalt der Akademie der Wissenschaften in Wien[1]).]

(Eingegangen am 31. März 1922.)

Der eine von uns hat auf der Naturforscher- und Ärzteversammlung in Salzburg im Jahre 1909 über vorläufige Untersuchungen, welche sich auf das Verhalten verschiedener pflanzlicher Organextrakte gegeneinander bezogen, berichtet[2]).

Es wurde damals ausgeführt, daß bei Herstellung von gekochten Auszügen aus diversen Pflanzenorganen mit dem gleichen Extraktionsmittel, nach Vermischung von 2 solchen Flüssigkeiten keine Trübung und kein Niederschlag auftrat. Zu einer solchen Reaktion kam es nur, wenn zu dem wässerigen Extrakte eines Organes (Blütenblättern, Kotyledonen etiolierter Keimlinge, Wurzeln) eine bestimmte Menge eines alkoholischen Auszuges der grünen Blätter derselben Pflanzenart zugesetzt wurde.

Von diesen Beobachtungen ausgehend haben wir neue Versuche mit pflanzlichen Organextrakten, welche teils mit Alkohol, teils mit Wasser dargestellt wurden, unternommen.

a) *Methodik.*

In den meisten Versuchen wurden die alkoholischen Extrakte in der Weise dargestellt, daß die betreffenden Pflanzenteile zerkleinert und mit 95 proz. Äthylalkohol zerrieben wurden. Bei einigen Versuchen haben wir die Extraktion der Organe mit siedendem Alkohol vorgenom-

[1]) Ein Auszug dieser Arbeit erschien unter dem Titel: Über Fällungsreaktionen in Chlorophyll- und anderen Farbstofflösungen. Vorläufige Mitteilung von *M. Eisler* und *L. Portheim* (Mitteilungen aus dem Staatlichen serotherapeutischen Institut und aus der Biologischen Versuchsanstalt der Akademie der Wissenschaften in Wien) im Akademischen Anzeiger 1922, Nr. 2—3.

[2]) *L. Portheim,* Eine neue arteigene Reaktion bei Pflanzen. Verhandl. d. Ges. dtsch. Naturforsch. u. Ärzte. 81. Versammlung zu Salzburg 1909, II. Teil; 1910, 170.

men. Die Filtration durch Papierfilter genügte, um ganz klare Flüssigkeiten zu erhalten.

Die wässerigen Auszüge wurden in der gleichen Weise gewonnen und durch scharfes Zentrifugieren von den suspendierten Teilchen befreit. Die homogenen aber noch trüben Flüssigkeiten haben wir mit destilliertem Wasser soweit verdünnt, daß sie höchstens opalescent waren.

Wir haben, wie schon erwähnt, die Extraktion der Organe gewöhnlich bei Zimmertemperatur ausgeführt, um einen evtl. Einfluß höherer Temperaturen auf die in Betracht kommenden Stoffe zu vermeiden. Von der Filtration durch Bakterienfilter oder gehärtete Papierfilter haben wir abgesehen, da durch sie viele, vielleicht an der Reaktion beteiligte Substanzen zurückgehalten werden können.

Die Reaktion der Flüssigkeiten wurde in einigen Fällen mit Phenolphthalein geprüft, die Blattauszüge waren schwach sauer, die Blütenextrakte nahezu neutral (siehe Auszug aus dem Versuchsprotokoll XVII).

b) Reaktion zwischen alkoholischen Blattextrakten und wässerigen Auszügen aus Blütenblättern.

Bei den ersten Versuchen wurden zu 0,5 ccm eines wässerigen Extraktes aus Blütenblättern 0,2 oder 0,4 ccm alkoholischer Blattauszüge zugesetzt. Meistens trat in den Röhrchen, welche 0,4 ccm der Chlorophyllösung enthielten, nach kürzerer oder längerer Zeit eine verschieden starke Trübung ein. In einzelnen Fällen bewirkten schon 0,2 ccm des Chlorophyllextraktes diese Reaktion; andere Proben blieben selbst mit 0,4 ccm des alkoholischen Auszuges klar. Die Verschiedenheit der Resultate hängt bei diesen Versuchen (siehe Auszug aus dem Versuchsprotokoll I), welche mit *Sinapis arvensis*, *Malva silvestris* und *Geranium pratense* durchgeführt wurden, nicht von der zur Extraktbereitung benützten Spezies, sondern von der Beschaffenheit der Auszüge ab, denn wir erhielten stärkere Trübungen sowohl bei Mischung der homologen als auch der heterologen Flüssigkeiten. Dagegen konnten wir 2 Umstände feststellen, welche die Fähigkeit der Extrakte, Trübungen und Fällungen zu liefern, beeinflußten.

Erstens hat sich gezeigt, daß die Auszüge nach 24stündigem Stehen im dunklen Kühlraume leichter fällbar waren[1]), zweitens, daß die Konzentration der alkoholischen Blattextrakte von Bedeutung war, indem bei einer stärkeren Verdünnung mit Alkohol nach Wasserzusatz keine oder eine schwächere Trübung eintrat.

[1]) Unter anderen Bedingungen (z. B. höhere Temperaturen, Einwirkung von Licht) fanden wir das umgekehrte Verhalten der Chlorophyllösungen, sie wurden beim Stehen gegen Wasser unempfindlicher.

Berücksichtigt man, daß Zusatz der entsprechenden Mengen von reinem Äthylalkohol zu den wässerigen Auszügen keinen Effekt hatte, und daß auch durch destilliertes Wasser in alkoholischen Blattextrakten keine in Betracht kommende Veränderung zustande kam, so muß man schließen, daß die beobachtete Trübung auf einer Wechselwirkung zwischen Stoffen der beiden Extrakte beruht.

In den nun folgenden Versuchen haben wir zu 0,4 ccm alkoholischen Blattauszügen meist kleinere Mengen der wässerigen Extrakte zugesetzt, um so jede auch noch so geringe Störung, welche durch das opalescente Aussehen der letzteren hervorgerufen werden könnte, zu vermeiden.

Bei jedem Versuche wurde nun zunächst das Verhalten des alkoholischen Auszuges gegenüber Aqua destillata untersucht und getrachtet, die Lösungen so einzustellen, daß Wasserzusatz erst nach einiger Zeit wirkte. Trat die Wassertrübung im Proberöhrchen sofort ein, so fügten wir noch etwas Alkohol zur Chlorophyllösung zu, wodurch, wie bereits bei Besprechung der ersten Versuchsreihe hervorgehoben wurde, die Stabilität der Chlorophyllauszüge erhöht wurde. Die Reaktionsfähigkeit solcher alkoholischer Chlorophyllextrakte, welche bei der üblichen Probe mit Wasser unempfindlich waren, wurde durch weiteren Wasserzusatz hergestellt.

Durch die Ausarbeitung dieser Methodik war es uns möglich, die komplizierten Vorgänge, welche bei der Mischung der beschriebenen Flüssigkeiten hervorgerufen werden, einer genaueren Analyse zu unterziehen.

Infolge der Natur unserer Auszüge mußte untersucht werden, welchen Einfluß einerseits destilliertes Wasser auf alkoholische Extrakte, andererseits reiner Alkohol auf wässerige Auszüge und schließlich die aus den Organen stammenden Stoffe aufeinander ausübten.

Raummangel hindert uns leider, unsere zahlreichen Versuche anzuführen; wir müssen uns mit der Wiedergabe einiger Beispiele aus unseren Protokollen begnügen.

In den in der Tabelle unter I. angeführten Versuchen haben wir je 0,4 ccm Chlorophyllextrakt mit steigenden Mengen von wässerigen Blütenauszügen versetzt. Je mehr von dem Blütenextrakte zugesetzt wurde, desto stärker war die Reaktion.

Bei der folgenden Versuchsreihe (Tabelle I) haben wir speziell die eventuelle Wirkung des destillierten Wassers und Alkohols berücksichtigt, indem wir 0,4 ccm der alkoholischen Blattauszüge und 0,4 ccm der wässerigen Blütenextrakte mit den gleichen Mengen von destilliertem Wasser resp. Alkohol vermischten. Außerdem fügten wir zu den Chlorophyllösungen wieder abgemessene Mengen von 0,1—0,4 ccm der Blütenstoffe hinzu, wobei das Volumen der Proben mit destilliertem Wasser auf 0,4 ccm ergänzt wurde. Da wir also in diesem Falle in allen Röhrchen

Fortsetzung Seite 504.

Tabelle I. **Auszug aus dem Versuchsprotokoll. Reaktion**

Datum 1920	Pflanze	Pflanzen-organe	Extrak-tionsmittel	Verw. Menge ccm	Zusatz	Pflanze	Pflanzen-organe
17. VI.	Sinapis arvensis	Blütenblätter	dest. Wasser	0,5		Sinapis arvensis	Laubblätter
	„ „	„	„	0,5		„ „	„
	„ „	„	„	0,5		„ „	„
	„ „	„	„	0,5		Malva silvestris	„
	„ „	„	„	0,5		„ „	„
	„ „	„	„	0,5		Sinapis arvensis	„
	„ „	„	„	0,5		„ „	„
18. VI.	Sinapis arvensis	„	„	0,5		„ „	„
	„ „	„	„	0,5		„ „	„
	„ „	„	„	0,5		Malva silvestris	„
	„ „	„	„	0,5		„ „	„
	„ „	„	„	0,5		Geranium pratense	„
	„ „	„	„	0,5		„ „	„
	Geranium pratense	„	„	0,5		„ „	„
	„ „	„	„	0,5		„ „	„
	„ „	„	„	0,5		Malva silvestris	„
	„ „	„	„	0,5		„ „	„
	„ „	„	„	0,5		Sinapis arvensis	„
	„ „	„	„	0,5		„ „	„
			„	0,5		„ „	„
			„	0,5		„ „	„
			„	0,5		Malva silvestris	„
			„	0,5		„ „	„
			„	0,5		Geranium pratense	„
			„	0,5		„ „	„
	Sinapis arvensis	„	„	0,5			
	„ „	„	„	0,5			
	Geranium pratense	„	„	0,5			
	„ „	„	„	0,5			
25. VI.	Sinapis arvensis	„	„	0,4	Blütenextrakte 1:1 mit dest. Wasser verdünnt	Sinapis arvensis	„
	„ „	„	„	0,4		„ „	„
	„ „	„	„	0,4		„ „	„
	„ „	„	„	0,4		Malva silvestris	„
	„ „	„	„	0,4		„ „	„
	„ „	„	„	0,4		„ „	„
	„ „	„	„	0,4		Sinapis arvensis	„
	„ „	„	„	0,4		„ „	„
	„ „	„	„	0,4		„ „	„
	„ „	„	„	0,4		Malva silvestris	„
	„ „	„	„	0,4		„ „	„
	„ „	„	„	0,4		„ „	„
22. VI.	Sinapis arvensis	Laubblätter	95prz. Alkoh.	0,4		Sinapis arvensis	Blütenblätter
	„ „	„	„	0,4		„ „	„
	„ „	„	„	0,4		„ „	„
	Malva silvestris	„	„	0,4		„ „	„
	„ „	„	„	0,4		„ „	„
	„ „	„	„	0,4		„ „	„
	Geranium pratense	„	„	0,4		„ „	„
	„ „	„	„	0,4		„ „	„
	„ „	„	„	0,4		„ „	„
	Sinapis arvensis	„	„	0,4			„
	Malva silvestris	„	„	0,4			„
	Geranium pratense	„	„	0,4			„

zwischen alkoholischen Blatt- und wässerigen Blütenextrakten.

Extraktionsmittel	Verw. Menge ccm	Reaktion	Bemerkungen
5prz. Alkoh.	0,2	Spur Trübung	
" "	0,2	Spur Trübung	Blattextrakt durch Kochen erzeugt.
" "	0,4	sehr starke Trüb., viell. allerfeinste Stäubchen	
" "	0,2	klar	
" "	0,4	starke Trübung	
" "	0,2	klar	Extrakte nach Mischung 1 Stunde im Brut-
" "	0,4	klar	schrank bei 36°.
" "	0,2	θ am Abend θ	0,7 g der Laubblätter mit 7 ccm 95 proz
" "	0,4	θ " " ?	Alkohol zerrieben.
" "	0,2	θ " " θ	0,7 g Blütenblätter von Geranium mit 14 ccm,
" "	0,4	Trübung " " sehr stark trüb	0,5 g Blütenblätter von Sinapis mit 10 ccm
" "	0,2	Trübung " " leicht trüb	dest. Wasser zerrieben.
" "	0,4	stark. Trübung " " sehr stark trüb	
" "	0,2	θ " " θ	Chlorophyllextrakte filtriert, dann auf Eis
" "	0,4	Spur Trübung " " trüb	aufbewahrt.
" "	0,2	θ " " θ	Blütenextrakte zentrifugiert, überstehende
" "	0,4	θ " " θ	Flüssigkeit dreifach verdünnt.
" "	0,2	θ " " θ	
" "	0,4	θ " " θ	Alle Geranium-Chlorophylle gelb verfärbt.
" "	0,2	θ " " θ	
" "	0,4	θ " " θ	
" "	0,2	θ " " θ	
" "	0,4	θ " " θ	
" "	0,2	θ " " θ	
" "	0,4	θ " " stark trüb und gelb	
" "	0,2	θ	
" "	0,4	θ	
" "	0,2	θ	
" "	0,4	θ	
" "	0,4	stark trüb	
" "	0,2	leicht trüb	Blattextr. m. 0,2 ccm 95pz. Alkoh. a. 0,4 ccm erg.
" "	0,1	opalescent	" " 0,3 " " " " 0,4 " "
" "	0,4	stark trüb } nach ca. $^1/_4$ Stunde.	
" "	0,2	leicht trüb } Gleich nach Zusatz war auch in	" " 0,2 " " " " 0,4 " "
" "	0,1	opalescent } den Proben mit 0,4 und 0,2 ccm	" " 0,3 " " " " 0,4 " "
" "	0,4	stark trüb } Chlorophyll bei den konzentrier-	
" "	0,2	leicht trüb } ten Blütenextrakten stärkere	" " 0,2 " " " " 0,4 " "
" "	0,1	θ } Fällung als bei den 1:1	" " 0,3 " " " " 0,4 " "
" "	0,4	stark trüb } verdünnten.	
" "	0,2	opalescent	" " 0,2 " " " " 0,4 " "
" "	0,1	θ	" " 0,3 " " " " 0,4 " "
dest. Wasser	0,4	stark trüb	
" "	0,2	trüb	Blütenextr. m. 0,2 ccm dest. Wass. a. 0,4 ccm erg.
" "	0,1	mäßig trüb	" " 0,3 " " " " 0,4 " "
" "	0,4	stark trüb	
" "	0,2	trüb	" " 0,2 " " " " 0,4 " "
" "	0,1	nach { mäßig trüb	" " 0,3 " " " " 0,4 " "
" "	0,4	ca. $^1/_2$ Stunde { sehr stark trüb	
" "	0,2	sehr stark trüb	" " 0,2 " " " " 0,4 " "
" "	0,1	trüb	" " 0,3 " " " " 0,4 " "
" "	0,4	θ	
" "	0,4	θ	
" "	0,4	opalescent, grüngelb	

Tabelle I. (Fortsetzung.) Auszug aus dem Versuchsprotokoll.

Datum 1920	Pflanze	Pflanzen-organe	Extrak-tionsmittel	Verw. Menge ccm	Zusatz	Pflanze	Pflanzen-organe
5. VII.	Sinapis arvensis	Laubblätter	95prz. Alkoh.	0,4		Sinapis arvensis	Blütenblätter
	,, ,,	,,	,, ,,	0,4		,, ,,	,,
	,, ,,	,,	,, ,,	0,4		,, ,,	,,
	,, ,,	,,	,, ,,	0,4		Melilotus officinalis	,,
	,, ,,	,,	,, ,,	0,4		,, ,,	,,
	,, ,,	,,	,, ,,	0,4		,, ,,	,,
	Melilotus officinalis	,,	,, ,,	0,4		Sinapis arvensis	,,
	,, ,,	,,	,, ,,	0,4		,, ,,	,,
	,, ,,	,,	,, ,,	0,4		,, ,,	,,
•	,, ,,	,,	,, ,,	0,4		Melilotus officinalis	,,
	,, ,,	,,	,, ,,	0,4		,, ,,	,,
	,, ,,	,,	,, ,,	0,4		,, ,,	,,

Tabelle II. Wirkung des Eiweißes aus wässerigen

Datum 1920	Pflanze	Pflanzen-organe	Extrak-tionsmittel	Verw. Menge ccm	Pflanze	Pflanzen-organe	Eiweiß
14. VII.	Sinapis arvensis	Laubblätter	95prz. Alkoh.	0,2		Blütenblätter	
	Campanula sp.	,,	,, ,,	0,2	Campanula sp.	,,	
	,,	,,	,, ,,	0,2	,,	,,	+* +*
	,,	,,	,, ,,	0,2	Sinapis arvensis	,,	
	,,	,,	,, ,,	0.2	,, ,,	,,	+* +*
	Sinapis arvensis	,,	,, ,,	0,4	,, ,,	,,	
	Campanula sp.	,,	,, ,,	0,4	,, ,,	,,	
	Atropa Belladonna	,,	,, ,,	0,4	,, ,,	,,	
	Campanula	,,	,, ,,	0,4	Campanula sp.	,,	
	Atropa Belladonna	,,	,, ,,	0,4	,,	,,	
	Sinapis arvensis	,,	,, ,,	0,4	,,	,,	
	Campanula sp.	,,	,, ,,	0,4	Atropa Belladonna	,,	
	Atropa Belladonna	,,	,, ,,	0,4	,, ,,	,,	
	Sinapis arvensis	,,	,, ,,	0,4	,, ,,	,,	
14. VII.	Campanula sp.	,,	,, ,,	0.4	Sinapis arvensis	,,	
	,,	,,	,, ,,	0,4	,, ,,	,,	
		,,	,, ,,	0,4	,, ,,	,,	
	,,	,,	,, ,,	0,4	,, ,,	,,	+**
	,,	,,	,, ,,	0,4	,, ,,	,,	
	,,	,,	,, ,,	0,4	,, ,,	,,	+**
	,,	,,	,, ,,	0,4	,, ,,	,,	
	,,	,,	,, ,,	0,4	Atropa Belladonna	,,	
	Sinapis arvensis	,,	,, ,,	0,4	,, ,,	,,	
	Atropa Belladonna	,,	,, ,,	0,4	,, ,,	,,	
	Campanula sp.	,,	,, ,,	0,4			
	Sinapis arvensis	,,	,, ,,	0,4			
	Atropa Belladonna	,,	,, ,,	0,4			
	Campanula sp.	,,	,, ,,	0,4			
	,,	,,	,, ,,	0,4			
	,,	,,	,, ,,	0,4	Sinapis arvensis	,,	
	,,	,,	,, ,,	0,4	Campanula sp.	,,	
	,,	,,	,, ,,	0.4	Sinapis arvensis	,,	
	,,	,,	,, ,,	0,4	Atropa Belladonna	.	

*) Blütenblätter von Sinapis, Atropa und Campanula wurden am 12. VII. 1920 in dest. Blütenextrakt 95 proz. Alkohol in 4facher Menge zugesetzt. Nach erfolgter Flockenb. wurde zentri-

**) Der mit Alkohol gefällte Niederschlag löst sich nicht vollständig oder überhaupt nicht

Reaktion zwischen alkoholischen Blatt- und wässerigen Blütenextrakten.

Extraktionsmittel	Verw. Menge ccm	Reaktion	Bemerkungen
dest. Wasser	0,4	sofort trüb, nach einigen Minuten stark trüb	
„ „	0,2	„ trüb, „ „ „ trüb	
„ „	0,1	„ θ „ „ „ opalescent	
„ „	0,4	„ trüb, „ „ „ stark trüb	
„ „	0,2	„ trüb, „ „ „ trüb	
„ „	0,1	„ θ „ „ „ θ	
„ „	0,4	„ trüb, „ „ „ stark trüb	
„ „	0,2	„ trüb, „ „ „ trüb	
„ „	0,1	„ θ „ „ „ opalescent	
„ „	0,2	„ trüb, „ „ „ stark trüb	
„ „	0,2	„ trüb, „ „ „ trüb	
„ „	0,1	„ θ „ „ „ θ	

Blütenextrakten auf alkoholische Chlorophyllauszüge.

Extraktionsmittel	Verw. Menge ccm	Reaktion	Bemerkungen
dest. Wasser	0,2	θ	
„ „	0,1	sofort Trübung, später Flocken	+ 0,1 ccm 95proz. Alkohol.
„ „	0,1	„ θ	+ 0,1 „ „ „
„ „	0,1	„ Flocken	Wäss. Eiweißaufschw. nochmals zugesetzt.
„ „	0,1	„ Trübung	+ 0,1 ccm 95proz. Alkohol.
„ „	0,1	„ θ	+ 0,1 „ „ „
„ „	0,1	„ Flocken	Wäss. Eiweißaufschw. nochmals zugesetzt.
„ „	0,1	„ Trübung, nach kurzer Zeit Flocken	
„ „	0,1	„ „ „ „ „ „ ?	
„ „	0,1	„ „ „ „ „ „ ?	
„ „	0,1	„ „ gleich darauf Flocken	
„ „	0,1	weniger trüb, dann Flocken	
„ „	0,1	sofort klar, dann Trüb., n. kurz. Zeit Flocken	
„ „	0,1	sofort Trübung und Flockenbildung	
„ „	0,1	klar und Flocken	
„ „	0,1	„ „ „	
„ „	0,2	sofort Trübung, keine Flocken	Blütenextrakt mit dest. Wasser 1 : 3 verdünnt.
„ „	0,1	„ „ „ „	„ „ „ „ 1 : 3 „
„ „	0,1	feine Flocken	
„ „	0,2	sofort Trübung	Eiweißaufschwemm. m. dest. Wass. 1 : 3 verd.
„ „	0,2	sofort Trübung, aber stärker als obige	Blütenextrakt mit dest. Wasser 1 : 3 verdünnt.
„ „	0,1	Trübung nach 1 Minute	Eiweißaufschwemm. m. dest. Wass. 1 : 8 verd.
„ „	0,1	sofort leichte Trübung	Blütenextrakt mit dest. Wasser 1 : 3 verdünnt.
„ „	0,1	„ Trübung	„ „ „ „ 1 : 3 „
„ „	0,1	klar, nach ca. 2 Minuten beginnt die Trübung	„ „ „ „ 1 : 3 „
„ „	0,1	klar, n. ca. 1 Min. fängt auch hier die Trüb. an	„ „ „ „ 1 : 8 „
„ „	0,4	sofort deutliche Trübung	
„ „	0,4	θ	
„ „	0,4	innerhalb der 1. Minute Spur Trübung	
„ „	0,2	leichte Trübung nach 1 Minute	
„ „	0,1	θ, nach einigen Minuten schwache Trübung	
„ „	0,1	sofort deutliche Trübung	Blütenextrakt mit dest. Wasser 1 : 3 verdünnt.
„ „	0,1	klar, nach kurzer Zeit auch trüb	„ „ „ „ 1 : 3 „
„ „	0,1	Spur Trübung, nach kurzer Zeit auch trüb	„ „ „ „ 1 : 3 „
„ „	0,1	sofort Trübung	„ „ „ „ 1 : 3 „

Wasser zerrieben und bis zum 14. VII. im Eisschrank stehen gelassen, dann wurde zum wässerigen fugiert u. das Abges. mit dest. Wasser aufgenommen. Man erhält eine stark trübe Suspension. in dest. Wasser. Die Flüssigkeit ist stark trüb, der Niederschlag sedimentiert wieder beim Stehen.

die gleiche Wasserquantität, aber verschiedene Mengen von Blütensubstanzen hatten, so ist der Schluß berechtigt, daß die stärkere Trübung, welche in den Proben mit konzentrierteren wässerigen Lösungen zu beobachten war, durch die in diesen enthaltenen Blütenstoffe bedingt wurde. Die Kontrollen mit 0,4 ccm reinem Alkohol oder destilliertem Wasser blieben innerhalb der Beobachtungszeit klar und haben somit unsere Schlußfolgerung bestätigt.

Der Eintritt der erwähnten Reaktion mit Blütenextrakten machte sich zunächst in dem Auftreten eines gelblichen Tones und einer Trübung in der ursprünglich vollkommen klaren und blaugrünen Chlorophylllösung bemerkbar. Die Trübung wurde mit der Zeit stärker, es traten grüngefärbte Flocken auf, welche an Größe zunahmen und sich schließlich zu Boden senkten, wobei sich die überstehende Flüssigkeit teilweise entfärbte.

Setzt man zu den Blattauszügen destilliertes Wasser zu, so tritt, wie aus den oben angeführten Protokollen zu ersehen ist, in manchen Fällen innerhalb der Versuchszeit überhaupt keine Veränderung ein, in anderen Fällen ist eine Reaktion, welche der mit Blütenextrakten ähnlich ist, zu beobachten. Sie unterscheidet sich jedoch von dieser nicht nur durch ihren langsameren Verlauf und die dadurch bedingte verhältnismäßig geringere Intensität, sondern auch dadurch, daß zwar kleinere, aber nicht größere Mengen Wasser Fällungen hervorrufen (Tabelle XIII).

Schließlich wäre noch der Einfluß des reinen Alkohols auf die wässerigen Lösungen zu besprechen. Diese blieben je nach ihrer Beschaffenheit und den verwendeten Mengen unverändert oder ließen nach längerer Zeit eine Flockenbildung wahrnehmen. Eine solche kann aber mit unserer Reaktion nicht verwechselt werden, da sie viel später auftritt als die Chlorophyllfällung.

Diese neuerlichen Versuche haben gezeigt, daß die Trübungen und Fällungen, welche wässerige Blütenextrakte in alkoholischen Blattauszügen hervorrufen, weder durch Zusatz von destilliertem Wasser allein zu letzteren, noch durch Zufügen von reinem Alkohol zu ersteren erzeugt werden, und bestätigen so unsere früher ausgesprochene Annahme, daß die uns interessierende Fällungsreaktion auf einer gegenseitigen Beeinflussung des von uns hergestellten Blattextraktes und der wasserlöslichen Extraktionsstoffe aus Blüten beruht.

c) *Natur der an der Reaktion beteiligten Stoffe.*

Von den aus den Blütenblättern extrahierten Substanzen könnten für die in Frage stehende Reaktion Eiweißstoffe und daneben auch Salze in Betracht kommen. Diese haben wir nicht weiter berücksichtigt,

von der Voraussetzung ausgehend, daß sie in der verwendeten Verdünnung nicht mehr wirksam sind[1]).

Um den Einfluß der Eiweißstoffe festzustellen, haben wir diese mit 95 proz. Alkohol aus den Blütenauszügen gefällt und das Sediment in destilliertem Wasser aufgenommen. Damit erzielten wir in Chlorophyllextrakten die beschriebenen Trübungen und Fällungen (Tabelle II).

Bisher haben wir nur mit wässerigen Auszügen aus Blüten gearbeitet. Wir zogen nun auch andere, nicht chlorophyllhaltige Pflanzenorgane in unsere Untersuchung ein.

Zunächst haben wir uns aus Wurzeln, in derselben Weise wie aus Blüten, wässerige Extrakte hergestellt. Wie aus der Tabelle III zu ersehen ist, haben auch diese mit den Chlorophyllösungen in analoger Weise reagiert.

Da die Bedeutung des Eiweißes für die Reaktion nachgewiesen ist, haben wir Pflanzenorgane, welche sich durch ihren Eiweißreichtum auszeichnen, zu den Versuchen herangezogen und zwar Kotyledonen von *Phaseolus multiflorus* und *Ph. vulgaris* (Tabelle IV). Die Resultate unserer Versuche entsprachen auch hier unserer Vermutung. Zu bemerken wäre noch, daß, wenn auch ein Vergleich der Wirkung von Blütenextrakten mit Kotyledonenauszügen nicht ohne weiteres möglich ist, die letzteren noch in viel höheren Verdünnungen, als sie den Blütenextrakten entsprechen dürften, starke Reaktionen hervorriefen.

Unsere bisherigen Versuche haben gezeigt, daß wässerige, eiweißhaltige Auszüge aus den verschiedensten Pflanzenorganen imstande sind, in alkoholischen Blattextrakten Trübungen und Fällungen zu erzeugen.

Wir sind nun einen Schritt weiter gegangen und haben untersucht, ob diese Eigenschaft auch tierischem Eiweiß zukommt. In der Tat vermochte Pferdeserum bis zu 10 000 facher (d. h. einer ca. 100 000 fachen Eiweißverdünnung) und sogar in einzelnen Fällen in noch geringeren Konzentrationen Fällungen hervorzurufen (Tabelle V).

Besonderes Interesse verdient die Beobachtung, daß zuweilen hohe Serumverdünnungen, welche an und für sich nicht mehr Chlorophyll fällen, imstande sind, dieses vor der Veränderung durch Wasser zu schützen.

Die nächsten Versuche (Tabelle VI) sollten die Bedeutung verschiedener Abbauprodukte des Eiweißes für unsere Reaktion feststellen. Zu diesem Zwecke haben wir Chlorophyllösungen mit je 0,1 ccm verschiedener Verdünnungen von Pferdeserum, von neutraler Bouillon, welche 1% Wittepepton enthielt, von Seidenpepton und endlich mit

[1]) Speziell zu diesem Zwecke angestellte Versuche haben gezeigt, daß sich eine 100 fache Verdünnung einer 0,85 proz. Kochsalzlösung in ihrer Wirkung auf Chlorophyllösungen nicht von Aqua destillata unterschied.

Tabelle III. Reaktion zwischen alkoholischen

Datum 1920	Pflanze	Pflanzen-organ	Extrak-tionsmittel	Verw. Menge ccm	Zu-satz	Pflanze	Pflanzen-organ
19.VII.	Sonchus oleraceus	Laubblätter	95 prz. Alkoh.	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		Galinsoga parviflora	Wurz-
						„ „	„
	„ „	„	„ „	0,4		Sonchus oleraceus	„
						„ „	„
	„ „	„	„ „	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		Galinsoga parviflora	„
	„ „	„	„ „	0,4			
	Galinsoga parviflora	„	„ „	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4			„

Tabelle IV. Reaktion zwischen alkoholischen

Datum 1920	Pflanze	Pflanzen-organ	Extrak-tionsmittel	Verw. Menge ccm	Zu-satz	Pflanze	Pflanzen-organ
12. XI.	Phaseolus multiflorus	Laubblätter	95 prz. Alkoh.	0,4		Phaseolus multiflorus	Kotyled-
	„ „	„	„ „	0,4		Paseolus vulgaris	„
	„ „	„	„ „	0,4			
17. XI.	„ „	„	„ „	0,4		Phaseolus multiflorus	„
	„ „	„	„ „	0,4			„
				0,4		Phaseolus multiflorus	„
22. XI.	Phaseolus multiflorus	„	„ „	0,4		Phaseolus vulgaris	
	„ „	„	„ „	0,4			„
26. XI.	„ „	„	„ „	0,4			„
	„ „	„	„ „	0,4		„ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ „	„

Glycyltryptophan versetzt. Wenn wir den Stickstoffgehalt der einzelnen Lösungen beim Vergleiche ihrer Wirksamkeit berücksichtigen, so zeigt sich, daß das Serum weitaus am stärksten, die Bouillon schon bedeutend schwächer, Seidenpepton nur mehr spurenweise und nur in konzentrierter Lösung fällt, das Glycyltryptophan sich nicht von Wasser unterscheidet.

Man sieht also, daß dem koagulablem Eiweiß die stärkste Wirkung zukommt, daß die Albumosen und Peptone der Bouillon noch eine

Blatt- und wässerigen Wurzelextrakten.

Extraktionsmittel	Verw. Menge ccm	Reaktion	Bemerkungen
dest. Wasser	0,1	sofort trüb	Ursprünglich konzentriertes Chlorophyll.
„ „	0,1	„ θ	
„ „	0,1	„ Trübung	0,1 ccm Wurzelextr. zu obigem Vers. zuges.
„ „	0,1	„ θ	
„ „	0,1	„ Trübung	0,1 ccm Wurzelextrakt zu obigem Vers. zuges.
„ „	0,2	nach ca. 10 Minuten θ	
„ „	0,1	sofort Trübung	Chlorophyll nicht verdünnt.
„ „	0,1	θ	Ursprüngliche Chlorophyllösung, die gleich verdünnt wurde, nach langem Stehen, bei Zimmertemperatur. Wie bei den Blütenextrakten treten auch hier Flocken auf, aber später als bei Verwendung der Blütenextrakte. Bei Wurzelextraktzusatz tritt zuerst die typische Trübung und erst später die Flockenbildung auf.
„ „	0,2	sofort Trübung	Die Chlorophyllösung nach dem Zerreiben der Blätter verdünnt.
„ „	0,2	„ klar	Die Chlorophyllösung nach dem Zerreiben der Blätter verdünnt, aber erst ca. nach einer Minute verwendet.

Blatt- und wässerigen Kotyledonenextrakten.

Extraktionsmittel	Verw. Menge ccm	Reaktion	Bemerkungen
dest. Wasser	0,1	sofort Trübung, nach 10 Minuten sehr stark trüb, Flocken?	
„ „	0,1	sofort Trübung, nach 10 Minuten sehr stark trüb, feinste Flocken.	
„ „	0,1	sofort θ, nach 10 Minuten trüb	
„ „	0,1	sofort trüb, bald feine Flocken, nach ca. 3/4 Stunden große Flocken, sedimentiert	
„ „	0,1	sofort und nach einigen Minuten θ, nach ca. 3/4 Stunden θ, nach ca. 2 Stunden θ	
„ „	0,1	nach ca. 1/2 Stunde θ, nach 1 Stunde θ	
„ „	0,1	sofort trüb	
„ „	0,1	„ θ	
„ „	0,1	„ klar	
„ „	0,1	„ trüb	0,5 g Kotyledonen mit 10 ccm dest. Wasser zerrieben 1:200 verdünnt.
„ „	0,1	„ trüb, nach 10 Minuten Flocken	0,5 g Kotyledonen mit 10 ccm dest. Wasser zerrieben 1:400 verdünnt.
„ „	0,1	„ θ, nach 10 Minuten trüb	
„ „	0,1	nach 10 Minuten θ, nach 30—40 Minuten θ	

Reaktion geben, daß reines Pepton aber nur ganz schwach, die tieferen Abbauprodukte überhaupt nicht mehr wirken. Die stärker fällenden Eiweißkörper werden, wie schon hervorgehoben wurde, durch die verwendeten Alkoholmengen koaguliert, während das an der Grenze der Wirksamkeit stehende Seidenpepton in Alkohol gelöst wird.

Aus unseren Ausführungen geht die Bedeutung der Eiweißstoffe für das Zustandekommen der Fällungsreaktion in den alkoholischen

Fortsetzung Seite 512.

Tabelle V. Reaktion zwischen alkoholischen

Datum	Pflanze	Pflanzen-organ	Extrak-tionsmittel	Verw. Menge ccm	Zusatz	Eiweiß, Pflanze	Pflanzen-organ
10. XI.			95proz.Alkoh.	0,4		Pferdes. 100fach verd.	
			„ „	0,4		„ 500 „ „	
	Phaseolus multiflorus	Laubblätter	„ „	0,4		„ 500 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 1000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 5000 „ „	
10. XI.	„ „	„	„ „	0,4		„ 10000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		„ 5000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 100000 „ „	
12. XI.	Sambucus nigra	„	„ „	0,4		„ 1000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 10000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 5000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		„ 100 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 20000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 50000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4			
	Phaseolus multiflorus	„	„ „	0,4		„ 1000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 5000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 10000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4			
17. XI.	„ „	„	„ „	0,4		„ 100 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 1000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 1000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 10000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4			
			„ „	0,4		„ 100 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 10000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4			
			„ „	0,4		„ 1000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 100000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		„ 1000000 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4			
19. XI.	„ „	„	„ „	0,4		Phaseolus vulgaris	Kotyledonen
	„ „	„	„ „	0,4		Pferdes. 1000fach verd.	
	„ „	„	„ „	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		Phaseolus vulgaris	Kotyledonen
	„ „	„	„ „	0,4		Pferdes. 10000fach verd.	
	„ „	„	„ „	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		Phaseolus multiflorus	Kotyledonen
	„ „	„	„ „	0,4		„ „	„
	„ „	„	„ „	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		„ „	Kotyledonen
	„ „	„	„ „	0,4		Pferdes. 2000fach verd.	
	„ „	„	„ „	0,4			
			„ „	0,4		Pferdes. 1000fach verd.	
			„ „	0,4		Phaseolus multiflorus	Kotyledonen
22. XI.			„ „	0,4		„ vulgaris	„
	„ „	„	„ „	0,4		„ „	„
	„ „	„	„ „	0,4		Pferdes. 10000fach verd.	
	„ „	„	„ „	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		Phaseolus vulgaris	Kotyledonen
	„ „	„	„ „	0,4		„ „	„
	„ „	„	„ „	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		Pferdes. 10000fach verd.	
1. XII.	„ „	„	„ „	0,4			

Blattauszügen und tierischem Eiweiß.

Extraktionsmittel	Verw. Menge ccm	Reaktion	Bemerkungen
dest. Wasser	0,1	sofort leichte Trüb., nachm. leicht. Sediment	
„ „	0,1	nach 20—25 Min. θ. nachm. spärl. Sediment	
„ „	0,1	sofort trüb	Die Phaseolusblätt. v. Pflanz. a. d. Warmhaus
„ „	0,1	sofort trüb, nachmittag Spur Sediment	„ „ „ „ „ „ „
„ „	0,1	innerh. 1 Min. leicht trüb, n. 5 Min. stark. Trüb.	„ „ „ „ „ „ „
„ „	0,1	n. 1-2 Min. θ, n. 20 Min. ganz klar, nm. Spur trüb	„ „ „ „ „ „ „
„ „	0,1	nach 1—2 Min. Spur Trüb., n. 20 Min. leicht trüb	„ „ „ „ „ „ „
„ „	0,1	nach 1—2 Min. deutl., nach 20 Min. stark trüb	„ „ „ „ „ „ „
		nach 1 1/2 Std. sind i. d. Chlorophyllös. + Pferdeserum sehr starke Flock., in denen + dest. Wass. sehr stark. Trüb. ohne Flocken z. seh.	
„ „	0,1	wie rein. Wasser, sof. klar, n. ein. Min. leicht trüb	
„ „	0,1	nach 1 Minute Trübung	
„ „	0,1	„ 1 „ leichte Trübung	
„ „	0,1	„ 1 „ „ „	
„ „	0,1	„ 1 „ θ	
„ „	0,1	sofort trüb	
„ „	0,1	nach 5 Minuten schwach trüb } alle drei gleich	
„ „	0,1	„ 5 „ „ „ } alle drei gleich	
„ „	0,1	„ 5 „ „ „ } alle drei gleich	
„ „	0,1	sofort trüb, nach 1 Minute stark trüb	
„ „	0,1	sofort θ, nach 1 Minute leicht trüb	
„ „	0,1	sofort trüb	
„ „	0,1	sofort θ	
„ „	0,1	sofort trüb, nach einiger Zeit Flocken	
„ „	0,1	sofort θ	
„ „	0,2	sofort trüb	
„ „	0,2	„ „	
„ „	0,2	sofort θ	
„ „	0,1	sofort Trübung und Flocken	
„ „	0,2	sofort Trübung	
„ „	0,2	sofort θ	
„ „	0,2	nach 10 Minuten und sofort θ	
„ „	0,2	n. 1 Min. beginn. Trüb., n. einig. Zeit deutl. Trüb.	
„ „	0,2	sofort θ, nach einiger Zeit θ	
„ „	0,2	nach 5 Min. Spur Trüb., nach 20 Min. stark trüb	
„ „	0,2	n. 5 Min. leicht opalescent, n. 20 Min. leicht trüb	
„ „	0,1	n. 1 Min. Spur trüb, n. ca. 20 Min. trüb, Flocken	0,5 g Kotyledonen m. 10 ccm dest. Wass. zerrieb.
„ „	0,1	nach 1 Min. trüb, nach ca. 20 Min, trüb, Flocken	
„ „	0,1	nach 1 Minute θ, nach ca. 20 Minuten trüb	
„ „	0,1	n. 1 Min. Spur trüb, n. ca. 1/4 Std. trüb, Flocken	0,5 g Kotyl. m. 10 ccm dest. Wass. ger., 1 : 500 verd.
„ „	0,1	nach 1 Min. Spur trüb, nach ca. 1/4 Std. trüb	
„ „	0,1	nach 1 Minute θ, nach ca. 1/4 Stunde trüb	
„ „	0,1	sofort leicht trüb, nach ca. 10 Minuten trüb	Kotyl. v. etioliert. Bohnenkeimling.
„ „	0,1	sofort Beginn Trübung	„ „ „ „
„ „	0,1	sofort θ, nach ca. 10 Minuten θ	
„ „	0,1	nach 1 Minute trüb, nach ca. 1/2 Stunde trüb	„ „ „ „
„ „	0,1	„ 1 „ „ „ „ 1/2 „ „	
„ „	0,1	nach 1 Minute θ, nach 1/2 Stunde trüb	
„ „	0,1	nach ca. 1/2 Stunde θ	
„ „	0,1	„ „ 1/2 „ θ	„ „ „ „ , 1 : 500 verd.
„ „	0,1	nach einiger Zeit feinste Flocken	
„ „	0,1	n. ca. 2 Min. θ, n. ca. 1/4 Std. Spur trüb, etw. trüb. als Wasser gerade an der Erkennungsgrenze	
„ „	0,1	n. ca. 2 Min. beginn. Trübung, n. ca. 1/4 Std. trüb	0,5 g Kotyl. m. 10 ccm dst. Wass. zerr.
„ „	0,1	nach ca. 2 Min. θ, nach ca. 1/4 Stunde Spur trüb	
„ „	0,1	nach 1 Minute trüb	0,5 g „ „ 10 „ „ „ „ 1 : 200 verd.
„ „	0,1	nach 1 Minute trüb, nach ca. 10 Min. Flocken	0,5 g „ „ 10 „ „ „ „ 1 : 500 verd.
„ „	0,1	nach 1 Minute θ	
„ „	0,1	n. 1 Min. leicht trüb, n. ca. 20 Min. allerf. Flocken	
„ „	0,1	sofort θ	

Tabelle V. (Fortsetzung.) Reaktion zwischen alkoholischen

Datum 1921	Pflanze	Pflanzen-organ	Extrak-tionsmittel	Verw. Menge ccm	Zusatz	Eiweiß. Pflanze	Pflanzen-organ
1. XII.	Phaseolus multiflorus	Laubblätter	95proz. Alkoh.	0,4		Pferdes. 1000fach verd.	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 20 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 100 „ „	
	„ „	„	„ „	0,4		„ 1000 „ „	

Tabelle VI. Reaktion zwischen alkoholischen

Datum 1921	Pflanze	Pflanzen-organ	Extrak-tionsmittel	Verw. Menge ccm	Zusatz	Abbauprod. d. Eiweißes
10. XI.	Phaseolus multiflorus	Laubblätter	95proz. Alkoh.	0,4		Neutral-Bouillon
	„ „	„	„ „	0,4		Neutr.-Bouill. 10 f. verd.
12. XI.	„ „	„	„ „	0,4		Glycyltrypt. 10 f. verd.
	„ „	„	„ „	0,4		
	„ „	„	„ „	0,4		Seidenpepton 1% Lös.
	„ „	„	„ „	0,4		Glycyltrypt. 1:1 verd.
	„ „	„	„ „	0,4		
	„ „	„	„ „	0,4		Seidenp. 1% Lös. 1:1 verd.
	„ „	„	„ „	0,4		„ 1% „ 4 f. verd.
	„ „	„	„ „	0,4		
12. XI.	Sambucus nigra	„	„ „	0,4		Neutr.-Bouillon
	„ „	„	„ „	0,4		„ „ 1:10 verd.
	„ „	„	„ „	0,4		„ „ 1:50 „
	„ „	„	„ „	0,4		„ „ 1:100 „
3. XII.			„ „	0,4		Neutral-Bouillon
			„ „	0,4		Seidenpepton
			„ „	0,4		Glycyltryptophan

Tabelle VII. Reaktion zwischen alkoholischen Lösungen

Datum 1921	Pflanze	Pflanzen-organe	Extraktionsm. Lösungsm.	Verw. Menge ccm	Zusatz	Eiweiß. Pflanze	Pflanzen-organ
1. XII.	Phaseolus multiflorus	Laubblätter	95proz. Alkoh.	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		Pferdes. 1000fach verd.	
			„ „	0,4		„ 1000 „ „	
18. X.	Quercus robur	„	„ „	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		Dahlia	Blütenblätter
	„ „	„	„ „	0,4		„	„
	„ „	„	„ „	0,4			
18. X.	„ „	„	„ „	0,4		„	„
	„ „	„	„ „	0,4		„	„
			„ „	0,4		„	„
17. XI.	Daucus Carota	Wurzel	„ „	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		Phaseolus multiflorus	Kotyledonen
26. XI.	Phaseolus multiflorus	Laubblätter	„ „	0,4		Phaseolus vulgaris	„
	„ „	„	„ „	0,4			
			„ „	0,4		„ „	„
	„ „	„	„ „	0,4		„ „	„
	„ „	„	„ „	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		„ „	„
19. XI.	„ „	„	„ „	0,4		Phaseolus multiflorus	„
	„ „	„	„ „	0,4			

Blattauszügen und tierischem Eiweiß.

Extrak-onsmittel rdünnt m.	Verw. Menge ccm	Reaktion	Bemerkungen
st. Wasser	0,1	sofort schwache Trübung	
" "	0,1	starker kompakter Niederschlag, löst sich nach Wasserzusatz leicht	
" "	0,1	weniger stark kompakter Niederschlag, löst sich nach Wasserzusatz schlechter	
" "	0,1	noch weniger, nicht kompakter Niederschlag, löst sich nach Wasserzusatz am schlechtest.	

Blattauszügen und Abbauprodukten des Eiweißes.

Extrak-ionsmittel	Verw. Menge ccm	Reaktion	Bemerkungen
	0,1	sofort Trübung	
est. Wasser	0,1	in der ersten Minute Trübung	
" "	0,1	sof. θ, n. 3 Min. θ, n. 20—25 Min. wie dest. Wass.	
" "	0,1	sof. θ, nach 3 Min. θ, nach 20—25 Min. stark trüb	
" "	0,1	innerh. d. erst. Min. trüb, n. 3 Min. deutl. trüb, n. 20—25 Min. n. etw. stärk. Trüb. a. dest. Wass.	
" "	0,1	sofort θ, nach 5 Min. beginn. ganz leichte Trüb.	
" "	0,1	sofort θ, nach 5 Min. beginn. ganz leichte Trüb.	
" "	0,1	sofort θ, nach 14 Minuten schwach trüb	
" "	0,1	" θ, " 14 " " "	
" "	0,1	" θ, " 14 " " "	
	0,1	sofort starke Trübung.	
" "	0,1	sofort leichte Trübung	
" "	0,1	sofort leichte Trübung	
" "	0,1	sofort θ, nach 2 Min. beginnende Trübung	
	0,1	heute starke Fällung	Versuch aufgestellt am 2. XII. 1921.
" "	0,1	θ	" " " 2. XII. 1921.
" "	0,1	θ	" " " 2. XII. 1921.

der einzelnen Chlorophyllkomponenten und Eiweiß.

Extrak-tionsmittel verdünnt m.	Verw. Menge ccm	Reaktion	Bemerkungen
dest. Wasser	0,1	sofort θ, nach ca. 1/2 Stunde stark trüb	Der alkoh. Blattextrakt m. Benzol geschüttelt.
" "	0,1	sofort trüb, nach ca. 1/2 Stunde Flocken	Benz. verd. Präp. v. 29. XI. b. heute i. Eisschr.
" "	0,1	nach ca. 1 Stunde θ	aufbew., heute m. 95 proz. Alkoh. aufgen.
" "	0,1	sofort θ	
" "	0,1	sofort Trübung	
" "	0,1	sofort sehr schwache Trübung	Laubblätter vergilbt.
" "	0,1	sofort θ	
" "	0,1	sof. trüb, n. 2 Min. viel stärk. trüb a. b. d. vergilbt	
" "	0,1	sofort θ, nach 2 Minuten leicht trüb	Laubblätter alt. vergilbt.
" "	0,1	nach 1/4 Stunde θ	
" "	0,1	sof. θ, n. ein. Min. trüb, n. ca. 3/4 Std. stark trüb,	
" "	0,1	sofort trüb, nach ca. 3/4 Stunden starke Flocken	
" "	0,1	sofort trüb. nach einigen Minuten Flocken, nach 20 Minuten sehr große Flocken	Laubblätter etioliert. 0,5 g Kotyledonen mit 10 ccm dest. Wasser zerrieb. 1:200 verdünnt.
" "	0,1	sofort θ, nach einigen Minuten leicht trüb	Laubblätter etioliert
" "	0,1	nach einig. Min. θ, nach ca. 20 Min. feine Flock.	0,5 g Kotyl. m. 10 ccm dest. Wass. zerr. 1:200 verd.
" "	0,1	sofort leicht trüb, nach ca. 40 Minuten starke Flocken	0,5 g Kotyl. m. 10 ccm dest. Wass. zerr. 1:400 verd. Laubblätter etioliert.
" "	0,1	sofort klar, nach ca. 40 Minuten trüb	Laubblätter etioliert.
" "	0,1	nach ca. 1 Stunde θ	Laubblätter etioliert. 0,5 g Kotyledonen mit 10 ccm dest. Wasser zerrieb. 1 : 800 verdünnt.
" "	0,1	sofort leicht trüb, nach 10 Minuten trüb	Laubbl. etioliert. Kotyled. v. etioliert. Pflanz.
" "	0,1	sofort θ, nach 10 Minuten θ	Laubblätter etioliert.

Blattauszügen hervor. Es war daher noch zu untersuchen, welche Substanzen in diesen letzteren bei der Reaktion eine Rolle spielen.

In dem Gemisch, das wie durch Extraktion von grünen Blättern mit 95 proz. Alkohol erhielten, kann nach unserer Ansicht nur das Chlorophyll für die Entstehung der intensiven Fällung in Betracht gezogen werden. Wie wir bei Besprechung des Reaktionsverlaufes geschildert haben, entstehen grüngefärbte Flocken, welche bei Entfärbung der überstehenden Flüssigkeit sedimentieren. Daraus sehen wir, daß das Chlorophyll gefällt wird. Wäre das Chlorophyll nicht direkt an der Reaktion mit den Eiweißkörpern der wässerigen Lösungen beteiligt, so könnte dieser Prozeß nur durch ein Mitreißen des Chlorophylls bei einer entstehenden Fällung bewirkt werden. Eiweißfällbare Lipoide können aber in den verwendeten Blattauszügen nur in so geringer Menge vorhanden sein, daß ein Mitreißen des Chlorophylls durch sie nicht anzunehmen ist.

Weitere Versuche sollten zeigen, ob auch mit den einzelnen Komponenten des grünen Blattfarbstoffes ein positiver Ausfall unserer Reaktion zu erzielen ist. Das alkoholische Rohchlorophyll wurde daher nach dem *Kraus*schen Verfahren[1]) mit Benzol geschüttelt. Die nur die grünen Komponenten der Chlorophyllösung enthaltende Fraktion wurde vorsichtig eingedampft und der Rückstand mit Alkohol aufgenommen. Diese Lösung hat mit Pferdeserum versetzt unsere typische Reaktion ergeben (Tabelle VII).

Andererseits trübten sich auch Extrakte aus vergilbten *Quercus*blättern (Tabelle VII), welche keine oder höchstens Spuren vom grünen Farbstoff enthielten, nach Zusatz von wässerigen Blütenauszügen.

Wir haben ferner das gelbe Pigment der Chlorophyllkörner von etiolierten Bohnenblättern[2]) (Tabelle VII) untersucht. Diese wurden in derselben Weise wie die grünen Blätter behandelt. Zusatz von entsprechenden Eiweißlösungen zu den alkoholischen Lösungen rief analoge Fällungserscheinungen hervor, wie wir sie in den chlorophyllhaltigen Extrakten beobachten konnten.

Da im grünen Blatt außer Xanthophyll auch Carotin vorhanden ist, haben wir auch alkoholische Auszüge aus der Wurzel von Daucus Carota gemacht. Auch in ihnen erzielten wir mit Eiweißlösungen positive Ergebnisse (Tabelle VII).

Die angeführten Versuche zeigen also, daß nicht nur das Rohchlorophyll, sondern auch alle seine einzelnen Komponenten in der beschriebenen Weise mit Eiweiß reagieren.

[1]) *Gr. Kraus*, Untersuchungen über Chlorophyllfarbstoffe, 1872; nach *F. Czapek*, Biochemie der Pflanzen, 1913, Bd. I, II. Aufl., S. 557.

[2]) Nach *R. Willstätter* und *A. Stoll* (Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, Berlin 1918, S. 134) ist der gelbe Farbstoff etiolierter Bohnenblätter weder Carotin noch Xanthophyll.

Fehlen aber diese Stoffe, so kommt es zu keiner Reaktion, wie Versuche mit alkoholischen Extrakten aus den ungefärbten Anteilen von panachierten Blättern lehren. Die grünen Partien derselben Blätter lieferten natürlich wirksame Extrakte (Tabelle VIII).

Nach den Untersuchungen von *Willstätter*[1]), die eine gleiche Beschaffenheit des Chlorophylls bei den einzelnen Pflanzenfamilien dartun, war zu erwarten, daß das uns beschäftigende Phänomen bei allen grünen Pflanzen nachzuweisen sei. Wir haben nun tatsächlich bei einzelnen Vertretern verschiedener Klassen von den Monokotyledonen bis hinunter zu den Algen die Fähigkeit der Chlorophyllfällung durch Eiweißstoffe feststellen können (Tabelle IX).

Diese Eigenschaft des Chlorophylls scheint nicht mit seiner assimilativen Tätigkeit zusammenzuhängen, da auch alkoholische Auszüge aus Blättern von Pflanzen, bei denen die Kohlensäureassimilation infolge niederer Temperatur aufgehoben oder auf ein Minimum beschränkt war, positive Reaktionen lieferten (Tabelle X).

d) *Verhalten anderer Farbstoffe gegen Eiweiß.*

Wegen der großen Ähnlichkeit, die bekanntlich zwischen bestimmten Derivaten des Blatt- und Blutfarbstoffes besteht, haben wir das Hämatoporphyrin in den Bereich unserer Untersuchungen gezogen. Dieses unterscheidet sich nach *Marchlewski*[2]) von dem durch ihn hergestellten Phyloporphyrin nur durch ein Plus von 2 Sauerstoffatomen.

Wir haben uns eine ziemlich konzentrierte Lösung von Hämatoporphyrin in 95proz. Alkohol hergestellt und diese Stammlösung einerseits mit $^1/_3$ Volumen destilliertem Wasser, andererseits mit $^1/_3$ Volumen Alkohol verdünnt. Zu je 4 Teilen dieser Lösungen fügten wir wie gewöhnlich einen Teil destillierten Wassers bzw. verschiedene Pferdeserumverdünnungen zu. Bei der wasserverdünnten Hämatoporphyrinlösung rief der weitere Zusatz von Wasser eine Fällung hervor, die in den Proben, welche Serum, selbst bis zu 100 000facher Verdünnung enthielten, ausblieb (Tabelle XI).

Man muß daher eine Schutzwirkung des Serums für das Hämatoporphyrin gegenüber der fällenden Wirkung des Wassers annehmen, ähnlich wie wir sie in einzelnen Fällen durch hohe, an sich nicht mehr fällende Serumverdünnungen bei der Ausflockung des Chlorophylls durch Wasser beobachtet haben. Hervorzuheben wäre, daß selbst 1000fache Serumverdünnungen, welche das Chlorophyll ausnahmslos

[1]) *R. Willstätter* und *A. Stoll*, Untersuchungen über Chlorophyll, Berlin 1913, S. 149; Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, Berlin 1918, S. 1.

[2]) *Marchlewski*, zitiert nach *O. Cohnheim*, Chemie der Eiweißkörper, III. Aufl., S. 332.

Tabelle VIII. Das Verhalten grüner

Datum	Pflanze	Pflanzenorgan	Extraktionsmittel	Verw. Menge ccm	Zusatz	Pflanze, Eiweiß	Pflanzenorgan
4. X.	Funkia lanceol. f. undul.	Laubblätter	95proz. Alkoh.	0,4			
	" " "	"	" "	0,4			
	" " "	"	" "	0,4		Funkia lanceol. f. undul.	Laubblätter
	" " "	"	" "	0,4		" " "	"
	" " "	"	" "	0,4		" " "	Wurzel
	" " "	"	" "	0,4		" " "	"
8. X.	" " "	"	" "	0,4		" " "	"
			" "	0,4		" " "	"
	" " "	"	" "	0,4			
	" " "	"	" "	0,4		" " "	"
11. X.	Glechoma hederacea	"	" "	0,4			
			" "	0,4		Glechoma hederacea	"
	" " "	"	" "	0,4		" "	"
	" " "	"	" "	0,4		" "	"

fällten, diese Wirkung auf das Hämatoporphyrin vermissen ließen. In den mit Alkohol verdünnten Hämatoporphyrinlösungen trat weder in den Serum- noch in den Wasserproben eine Veränderung auf. Offenbar war in diesen Lösungen der Wassergehalt zu gering, um eine Ausflockung des Farbstoffes hervorzurufen.

Die von uns hergestellte Hämatoporphyrinlösung kann also im Gegensatze zu unseren Chlorophyllösungen nicht durch Serumeiweiß gefällt werden.

Wir haben nun weiters auch Farbstoffe untersucht, welche mit Chlorophyll in keinem Zusammenhange stehen.

Zuerst stellten wir alkoholische Lösungen von Anthocyan aus Rotkrautblättern her, wobei allerdings auch die in verdunkelten Pflanzenteilen vorkommenden gelben Farbstoffe enthalten sein könnten. In diesen Extrakten trat nach Zusatz von Pferdeserum sofort eine Trübung ein (Tabelle XI). Eine solche wurde durch destilliertes Wasser in viel geringerem Grade hervorgerufen. Um festzustellen, ob wirklich das Anthocyan an dem Zustandekommen dieser Reaktion schuld ist, haben wir alkoholische Extrakte aus roten Rosenblättern, bei denen das Vorhandensein gelber Farbstoffe ausgeschlossen war, in der gleichen Weise untersucht und haben dieselben Resultate erzielt.

Schließlich prüften wir auch die alkohollöslichen Pigmente zweier Bakterienarten, und zwar von *Bacillus prodigiosus* und *Bac. violaceus* (Tabelle XI). Beide lieferten ein vollständig negatives Ergebnis.

und nicht grüner Teile panachierter Blätter.

Reaktionsmittel verdünnt mit	Verw. Menge ccm	Reaktion	Bemerkungen
dest. Wasser	0,1	sofort θ	Grüner Teil der Laubblätter.
" "	0,2	sofort leichte Opalenscenz	" " " "
" "	0,1	sofort Trübung	Alkohol. Extrakt des grünen u. wässerigen Extrakt des panachierten Teiles d. Laubbl.
95prz. Alkoh.	0,2	θ, nach ¼ Stunde auch noch θ	Alkohol. Extrakt des grünen u. panachierten Teiles der Laubblätter.
dest. Wasser	0,1	innerhalb 1 Minute deutliche Trübung, nach längerer Zeit starke Trübung	Grüner Teil der Laubblätter.
" "	0,1	θ, nach längerer Zeit feinste weiße Stäubchen	Panachierter Teil der Laubblätter.
" "	0,1	nach ¼ Stunde θ	" " " "
" "	0,1	nach ¼ Stunde θ, nach längerer Zeit ganz feine Flockung, so fein, daß es fraglich ist	
" "	0,1	nach 10 Minuten θ, nach längerer Zeit ganz feine Flockung, so fein, daß es fraglich ist	Grüner Teil der Laubblätter.
" "	0,1	nach 10 Minuten trüb	" " " "
" "	0,1	nach 5 Minuten θ	" " " "
" "	0,1	" 5 " θ	
" "	0,1	nach 1 Minute beginnende Trübung	" " " "
" "	0,1	nach 5 Minuten θ	Panachierter Teil der Laubblätter.

e) *Wesen der Reaktion.*

Unsere Versuche haben ergeben, daß sowohl das Chlorophyll und seine Komponenten als auch das Anthokyan in alkoholischer Lösung mit wässerigen Lösungen von pflanzlichem und tierischem Eiweiß Fällungen gibt.

Aus unseren früheren Ausführungen geht hervor, daß in den alkoholischen Extrakten die Farbstoffe, in den wässerigen die Eiweißstoffe beim Entstehen der Reaktion beteiligt sind. Eine Vorbedingung für das Zustandekommen derselben ist die Dispersitätsänderung, eventuell Fällung des betreffenden Farbstoffes in seiner alkoholischen Lösung durch Wasser. Durch Zusatz von Eiweiß wird diese Fällung wesentlich beschleunigt und verstärkt. Wenn auch das Wasser und der Alkohol bei der Entstehung der Reaktion mitwirken, so kann doch aus unseren zahlreichen Versuchen festgestellt werden, daß ihr positiver Ausfall nicht durch eine bloße Summation dieser beiden Wirkungen hervorgerufen werden kann, sondern daß dem Eiweiß ein besonderer Effekt zukommen muß.

Wegen der überragenden biologischen Bedeutung des Chlorophylls war unser Hauptaugenmerk auf die Auszüge aus grünen Blättern gerichtet. Die Untersuchung der anderen Farbstoffe haben wir nur zur Ergänzung unserer bei dem Chlorophyll gewonnenen Befunde vorgenommen.

Das Auftreten des Prozesses in den Blattauszügen äußerte sich in der Bildung grüngefärbter Flocken und verweisen wir diesbezüglich

Fortsetzung Seite 520.

Tabelle IX. Chlorophyllfällung durch Eiweißstoffe bei

Datum 1921	Pflanze	Pflanzen-organ	Extraktions-mittel	Verw. Menge ccm	Zusatz	Pflanze, Eiweiß	Pflanzen-organ
20. X.	Cladophora sp.	Thallus	95proz. Alkoh.	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		Dahlia	Blütenblätter
11. X.	Chara sp.	„	„ „	0,4		Glechoma hederacea	Wurzel
	„ „	„	„ „	0,4			
18. X.	Fontinalis antipyretica	Sprosse	„ „	0,4		Dahlia	Blütenblätter
	„ „	„	„ „	0,4			
20. X.	„ „	„	„ „	0,4		„	„
	„ „	„	„ „	0,4		„	„
18. X.	Adiantum sp.	Wedel	„ „	0,4		„	„
	„ „	„	„ „	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		„	„
20. X.			„ „	0,4		„	„
	Scolopendrium vulgare	„	„ „	0,4		„	„
	„ „	„	„ „	0,4			
29. X.	„ „	„	„ „	0,4		Tagetes	„
	„ „	„	„ „	0,4			
	Nephrodium molle	„	„ „	0,4		„	„
	„ „	„	„ „	0,4			
5. XI.	Scolopendrium vulgare	„	„ „	0,4		Phaseolus multiflorus	Wurzel
	„ „	„	„ „	0,4			
			„ „	0,4		„	„
18. X.	Equisetum arvense	Sprosse	„ „	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		Dahlia	Blütenblätter
	„ „	„	„ „	0,4		„	„
5. XI.	Pinus nigra	Nadeln	„ „	0,4			
	„ „	„	„ „	0,4		Phaseolus multiflorus	Wurzel
27. X.	Ophiopogon japonicus	Laubblätter	„ „	0,4		Tagetes	Blütenblätter
	Tradescantia guianensis	„	„ „	0,4		„	„
18. X.			„ „	0,4		Dahlia	„
	Dahlia sp.	„	„ „	0,4		„	„

einzelnen Vertretern verschiedener Pflanzenordnungen und Familien.

Extraktionsmittel verdünnt mit	Verw. Menge ccm	Reaktion	Bemerkungen
dest. Wasser	0,1	sofort θ, nach 2 Minuten θ	
.. ..	0,1	sofort θ, nach 2 Minuten leicht trüb	
.. ..	0,1	sofort sehr schwache, kaum merkliche Trübung, die nach ca. 1/4 Stunde nicht wesentlich zunimmt	
.. ..	0,1	sofort θ	
.. ..	0,1	nach 2 Minuten θ, nach 10 Minuten vielleicht eine Spur Trübung	
.. ..	0,1	nach 2 Minuten θ, nach längerer Zeit θ, nach 40 Minuten θ	
.. ..	0,1	sofort Spur, nach ca. 1 1/2 Stunden deutliche Trübung	
.. ..	0,1	sofort θ, nach ca. 1 1/2 Stunden θ	Chlorophyllösung verdünnt.
.. ..	0,1	sofort leichte Trübung	
.. ..	0,1	nach 2 Minuten θ, nach längerer Zeit leichte Trübung, nach ca. 40 Minuten trüb	
.. ..	0,1	sofort Trübung, nach 20—30 Minuten stark trüb, 19. X. früh starkes, zusammengeballtes Sediment von grüner Farbe	
.. ..	0,1	nach 1 Stunde θ, nach ca. 1 1/2 Stunden feine Flocken	
.. ..	0,1	sofort trüb, nach ca. 1 1/2 Stunden Flockenbildung	
.. ..	0,1	sofort θ, nach 1 Minute Opalescenz, nach ca. 1 1/2 Stunden trüb, aber keine Flocken	
.. ..	0,2	deutliche Trübung	
.. ..	0,2	Spur Trübung	
.. ..	0,2	deutliche Trübung	
.. ..	0,2	Spur Trübung	
.. ..	0,1	sofort leichte Trübung, nach ca. 1/2 Stunde Flocken, nach ca. 1 Stunde grobe, große Flocken, Sediment	
.. ..	0,1	sofort θ, nach ca. 1 Stunde sehr stark trüb, noch keine Flocken	
.. ..	0,1	nach ca. 1 Stunde feine Flocken	
.. ..	0,1	nach 2 Minuten θ, nach längerer Zeit Spur Trübung, nach 40 Minuten leicht trüb	
.. ..	0,1	sofort leichte Trübung	
.. ..	0,1	nach 1 Minute Spur Trübung, nach 20—30 Minuten leicht trüb, 19. X. früh: trüb, feinste Flocken	
.. ..	0,1	sofort schwache Trübung, nach ca. 1 Stunde feine Flocken	
.. ..	0,1	sofort starke Trübung, nach ca. 1/2 Stunde Flocken, nach ca. 1 Stunde grobe, große Flocken	
.. ..	0,1	nach einigen Minuten leicht trüb	
.. ..	0,1	nach einigen Minuten leichte Trübung	
.. ..	0,1	nach 10 Minuten θ	
.. ..	0,1	sofort beginnende Trübung	

Tabelle X. **Chlorophyllfällung durch Eiweißstoffe bei Pflanzen**

Datum 1921	Pflanze,	Pflanzen-organ	Extrak-tionsmittel	Verw. Menge ccm	Zusatz	Eiweiß, Pflanze	Pflanzen-organ
10. XI.	Phaseolus multiflorus	Laubblätter	95proz. Alkoh.	0,4		Phaseolus multiflorus	Kotyledonen
	" "	"	" "	0,4		" "	"
	" "	"	" "	0,4			
	" "	"	" "	0,4			
	Tradescantia guianensis	"	" "	0,4		Phaseolus multiflorus	Kotyledonen
	" "	"	" "	0,4			
	" "	"	" "	0,4			
	" "	"	" "	0,4		" "	"
			" "	0,4		" "	"

Tabelle XI. Verhalten anderer

Datum 1921	Pflanze, Farbstoff	Pflanzen-organ	Extraktions-mittel, Lösungsmittel	Verw. Menge ccm	Zusatz	Eiweiß, Pflanze	Pflanzen-organ
16. XII.	Haematoporphyrin		95proz. Alkoh.	0,4			
	"		" "	0,4		Pferdes. 1000 fach verd.	
	"		" "	0,4		" 1000 " "	
	"		" "	0,4		" 50000 " "	
	"		" "	0,4			
17. XII.	"		" "	0,4			
	"		" "	0,4		" 20000 " "	
	"		" "	0,4		" 100000 " "	
3. VI.	Rosa	Blütenbl.	" "	0,4			
	"		" "	0,4		" 1000 " "	
	"	"	" "	0,4		" 1000 " "	
17. XI.	Bacillus violaceus	Agarkultur	" "	0,4		Phaseolus multiflorus	Kotyledonen
	" "	"	" "	0,4			
	Bacillus prodigiosus	"	" "	0,4			
	" "	"	" "	0,4		" "	"
10. XII.	Rotkraut	Laubblätter	" "	0,4		Pferdes. 1000 fach verd.	
	"	"	" "	0,4			

die bei höheren und niederen Temperaturen kultiviert werden.

Extraktionsmittel	Verw. Menge ccm	Reaktion	Bemerkungen
est. Wasser	0,1	sofort deutliche Trübung, nach 20—25 Min. Flocken, Nachmittag starkes Sediment. Flüssigkeit licht	Pflanzen aus dem Warmhaus.
„ „	0,1	sofort deutliche Trübung, etwas stärker als warm, das Chlorophyll ist aber hier, der Farbe nach zu schließen, etwas stärker konzentriert, als bei obigem Versuch. Nachmittag starkes Sediment, Flüssigkeit licht.	„ „ „ Kalthaus.
„ „	0,1	sofort θ, nach einigen Minuten leichte Trübung, Nachmittag wenige fetzige Flocken, Flüssigkeit noch stark grün	„ „ „ „
„ „	0,1	sofort θ, nach einigen Minuten Spur Trübung, Nachmittag wenige fetzige Flocken. Flüssigkeit noch stark grün!	„ „ „ Warmhaus.
„ „	0,1	sofort deutliche Trübung, nach einigen Minuten stark trüb mit Flocken.	„ „ „ „
„ „	0,1	sofort θ, nach einigen Minuten trüb	„ „ „ „
„ „	0,1	sofort θ, nach einigen Minuten trüb	„ „ „ Kalthaus.
„ „	0,1	sofort trüb, nach einigen Minuten stark trüb mit feinsten Flocken	„ „ „ „
„ „	0,1	nach 20—25 Minuten θ, nach $1^{1}/_{2}$ Stunden allerfeinste Flocken? Nachmittag spärliches Flockensediment, Flüssigkeit klar	

Farbstoffe gegen Eiweiß.

Extraktionsmittel	Verw. Menge ccm	Reaktion	Bemerkungen
lest. Wasser	0,1	nach $^{3}/_{4}$ Stunden deutliche Flocken	Konzentr. alkohol. Lösung, ein Teil mit $^{1}/_{2}$ Volumen dest. Wasser versetzt.
„ „	0,1	nach $^{3}/_{4}$ Stunden klar	dgl.
„ „	0,1	nach $2^{1}/_{2}$ und 6 Stunden θ	Konzentr. alkohol. Lösung, ein Teil mit $^{1}/_{2}$ Volumen 95 proz. Alkohol verdünnt.
„ „	0,1	nach $2^{1}/_{2}$ und 6 Stunden θ	dgl.
„ „	0,1	nach $2^{1}/_{2}$ und 6 Stunden θ	dgl.
„ „	0,1	nach 2 Stunden leicht trüb, nach 17 Stunden grobflockiges Sediment	Konzentr. alkohol. Lösung, zu einem Teil etwas mehr als $^{1}/_{3}$ des Volumens mit dest. Wasser zugesetzt.
„ „	0,1	nach 2 und 17 Stunden klar	dgl.
„ „	0,1	nach 2 und 17 Stunden klar	dgl.
„ „	0,1	nach 10 Minuten θ, nach 35 Minuten Spur trüb	
„ „	0,1	sofort θ, nach 10 Minuten θ, nach 25 Minuten θ	
„ „	0,1	sofort trüb, nach 10 Minuten deutliche Flocken, nach 35 Min. reichliche Flocken	
„ „	0,1	nach circa $^{1}/_{2}$ Stunde θ	
„ „	0,1	nach circa $^{1}/_{2}$ Stunde θ	
„ „	0,1	nach circa $^{1}/_{2}$ Stunde θ	
„ „	0,1	nach circa $^{1}/_{2}$ Stunde θ	
„ „	0,1	sofort Trübung, nach 10 Minuten stark trüb	
„ „	0,1	sofort θ, nach 10 Minuten schwach trüb.	

auf unsere früher gemachten Angaben. Die Eiweiß-Chlorophyllverbindung, welche nach allen unseren experimentellen Ergebnissen angenommen werden muß, fällt in der gegebenen Flüssigkeit (4 Teile Alkohol + 1 Teil destilliertes Wasser) besonders leicht aus. Da unter den von uns eingehaltenen Versuchsbedingungen reiner Alkohol bei so verdünnten Eiweißlösungen keine makroskopische Veränderung hervorrief und reines Wasser auf das Chlorophyll keine solche Wirkung wie das Eiweiß hatte, kann die Fällung nur dadurch zustande kommen, daß die in ihrer Dispersität herabgesetzten Chlorphyllteilchen und das Eiweiß eine Adsorptionsverbindung eingehen. Infolge seiner Zusammensetzung fällt dieser Komplex in der alkoholischen Flüssigkeit von bestimmter Konzentration aus[1]).

Wenn dieser Niederschlag wirklich eine Eiweiß-Chlorophyllverbindung darstellt, so müßte die Möglichkeit bestehen, ihn vermöge seiner Eiweißkomponente in Wasser zu lösen.

Zu je 4 Teilen eines alkoholischen Blattauszuges wurde je 1 Teil verschiedener Pferdeserumverdünnungen in destilliertem Wasser zugesetzt. Wie aus dem Versuchsprotokoll (Tabelle V) hervorgeht, traten in der Probe, welche 20fach verdünntes Pferdeserum enthielt, sofort Flocken auf, die sich in kurzer Zeit zu einer starken Fällung verdichteten. Weniger stark und langsamer trat die Ausflockung bei Verwendung von 100fach verdünntem und in noch geringerem Grade bei 1000fach verdünntem Serum ein.

Einige Minuten nach dem Serumzusatz wurden die Proben scharf zentrifugiert, die überstehende noch mehr oder weniger tingierte Flüssigkeit abgegossen und der grüngefärbte Rückstand durch Absaugen mittels Fließpapiers möglichst von Alkoholspuren befreit. Diese Niederschläge wurden mit der dem Alkohol entsprechenden Menge destillierten Wassers versetzt.

Bei den durch 20fach verdünntes Pferdeserum gewonnenen Sedimenten konnte nach Zusatz von Aqua destillata ein langsames Diffundieren des grünen Farbstoffes in das Wasser beobachtet werden. Durch leichtes Schütteln ließ sich die Lösung des Niederschlages beschleunigen und führte zu einer mehr oder weniger stark opalescenten Lösung. Diese war sehr beständig, da weder eine Sedimentierung noch eine Veränderung des grünen Farbstoffes auftrat, selbst dann nicht, wenn eine solche Probe durch längere Zeit bei Zimmertemperatur dem Tageslichte ausgesetzt wurde. Weniger vollständig war die Lösung der Sedimente, welche in Chlorophyllösungen durch 100fach und 1000fach verdünntes Pferdeserum erzielt wurden.

[1]) Die allerdings nur sehr schwache Wirkung des Seidenpeptons auf alkoholische Chlorophyllösungen kann wegen seiner Alkohollöslichkeit nicht auf denselben Mechanismus zurückgeführt werden.

Die Löslichkeit der Niederschläge war aber auch von der Konzentration des Chlorphylls abhängig, insofern als selbst mit 20fach verdünntem Serum hervorgerufene Eiweiß-Chlorophyllfällungen, welche sehr intensiv grün gefärbt waren, sich nicht vollständig klar in Wasser lösen ließen. Noch schlechter war das Resultat in den Proben mit stärker verdünntem Serum (Tabelle XII).

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, daß die Löslichkeit des Eiweiß-Chlorophyllniederschlages im Wesen bedingt ist durch das Mengenverhältnis der beiden Komponenten. Eine vollständige Lösung gelingt nur dann, wenn für das vorhandene Chlorophyll genügend Eiweiß zur Verfügung steht; ist dessen Menge zu gering, so ist sie mangelhaft. Es ist daraus die Rolle des Eiweißes als Lösungsvermittler bei diesem Vorgange deutlich zu erkennen.

Ein weiterer Anhaltspunkt für unsere Ansicht ist der Umstand, daß zur Erzielung einer guten Löslichkeit die nach Serumzusatz auftretenden Flocken möglichst bald abzentrifugiert und vom Alkohol, der ja bei längerer Einwirkung eine Denaturierung des Eiweißes bewirkt, befreit werden. Besonders klare Lösungen erhielten wir dann, wenn wir die Niederschläge statt in destilliertem Wasser in 0,85 proz. Kochsalzlösung aufnahmen. Wir möchten diesen Unterschied darauf zurückführen, daß die Serumglobuline nur teilweise in destilliertem Wasser löslich sind.

Das Ergebnis unserer Untersuchungen, nach denen es möglich ist, eine wässerige Lösung von Chlorophyll aus alkoholischen Blattauszügen zu erzielen, ist nur so zu erklären, daß das Eiweiß in Verbindung mit dem grünen Farbstoff dessen Lösung ermöglicht.

Durch die Herstellungsweise solcher wässeriger Lösungen, in denen das Chlorophyll an Eiweiß gebunden ist, kann ersteres nur kolloidal gelöst sein. Aus dieser Flüssigkeit geht das Chlorophyll schwerer in Äther über als aus dem Alkohol.

Bei den wässerigen Lösungen des Blattchlorophylls fungiert das Eiweiß als Lösungsvermittler, andererseits ist bekannt, daß Eiweiß in Verbindung mit anderen Stoffen alkohollöslich wird. Wir selbst haben Versuche (Tabelle XII) unternommen, um festzustellen, ob das Chlorophyll Eiweiß in Alkohol zur Lösung bringen kann. Diesbezügliche Untersuchungen mit Blättern von Bohnen, Oleander und mit Gras haben ergeben, daß sich die Eiweißchlorophyllverbindungen unter gewissen Bedingungen in Alkohol vollständig lösen können. Das Resultat ist aber nicht nur von der Beschaffenheit der Blattextrakte, sondern auch von der Konzentration des zur Sedimentlösung verwendeten Alkohols abhängig. 95 proz. Alkohol eignet sich zu diesem Zwecke besser als 75 proz., weil der grüne Farbstoff in ihn besser übergeht.

Fortsetzung Seite 524.

Tabelle XII. **Löslichkeit des Eiweißchlorophyll-**

Datum 1920/21	Pflanze	Pflanzen-organe	Extrak-tionsmittel	Verw. Menge ccm	Zusatz: Eiweiß, Pflanze	Zusatz: Pflanz.-organe	Zusatz: Extrakt.	Verw. Menge ccm
29. XI.	Phaseol. multiflorus	Laubblätter	95 proz. Alk.	0,4	Phaseolus vulgaris	Kotyledonen	dest. Wass.	0,1
	„ „	„	„ „	0,4	„ „	„	„ „	0,1
	„ „	„	„ „	0,4	„ „	„	„ „	0,1
	„ „	„	„ „	0,4	„ „	„	„ „	0,1
	„ „	„	„ „	0,4	„ „	„	„ „	0,1
	„ „	„	„ „	0,4	Pferdes. 20—100 f. verd.		„ „	0,1
	„ „	„	„ „	0,4	„ 20—100 f. „		„ „	0,1
1. XII.	„ „	„	„ „	0,4			„ „	0,1
	„ „	„	„ „	0,4	Pferdes. 20 fach verd.		„ „	0,1
	„ „	„	„ „	0,4	„ 1000 „ „		„ „	0,1
	„ „	„	„ „	0,4	„ 100 „ „		„ „	0,1
	„ „	„	„ „	0,4	„ 20 „ „		„ „	0,1
	„ „	„	„ „	0,4	„ 100 „ „		„ „	0,1
	„ „	„	„ „	0,4	„ 1000 „ „		„ „	0,1
	„ „	„	„ „	0,4	obiger Versuch		„ „	0,1
26. I.	„ „	„	„ „	0,4	Pferdes. 20 fach verd.		„ „	0,1
22. VI.	Brassica oleracica	„	„ „	2			„ „	0,5
	„ „	„	„ „	2	„ 1000 „ „		„ „	0,5
	„ „	„	„ „	2	„ 100 „ „			
1. VII.	Phaseol. multiflorus	„	75 proz. „	2	„ 1000 „ „		„ „	0,5
	„ „	„	„ „	2	„ 1000 „ „		„ „	0,5
	„ „	„	95 proz. „	2	„ 1000 „ „		„ „	0,5
	„ „	„	„ „	2	„ 1000 „ „		„ „	0,5
4. VII.	Nerium Oleander	„	75 proz. „	2	„ 1000 „ „		„ „	0,5
	„ „	„	„ „	2	„ 1000 „ „		„ „	0,5
	„ „	„	95 proz. „	2	„ 1000 „ „		„ „	0,5
	„ „	„	„ „	2	„ 1000 „ „		„ „	0,5
	Gras	Blätter	„ „	2	„ 1000 „ „		„ „	0,5
	„	„	„ „	2	„ 1000 „ „		„ „	0,5
	„	„	75 proz. „	2	„ 1000 „ „		„ „	0,5
	„	„	„ „	2	„ 1000 „ „		„ „	0,5
21. I.	Phaseol. multiflorus	Laubblätter	„ „	0,4	„ 20 „ „		„ „	0,1
	„ „	„	„ „	0,4	„ 20 „ „		„ „	0,1

Niederschlages in dest. Wasser und Alkohol.

Lös. d. Eiw.-Chlorophyllniederschläge in	ccm	Reaktion	Bemerkungen
lest. Wasser	0,4	partielle Lösung, Lösung opalescent, grünlich, am 1. XII. Lösung scheinbar klarer als am 29. XI.	5 g Kotyledonen mit 10 ccm dest. Wasser zerrieben, 1:20 verdünnt.
45prz. Alkoh.	0,4	trübe Flüssigkeit, es fallen Flocken aus.	dgl.
lest. Wasser	0,4	partielle Lös., Lös. opalescent, grünlich, am 1. XII. Lös. scheinb. klarer als am 29. XI.	5 g Kotyledonen mit 10 ccm dest. Wasser zerrieben, 1 : 100 verdünnt.
45prz. Alkoh.	0,4	Lösung ganz klar	dgl.
lest. Wasser	0,4	der Niederschlag löst sich kaum mehr auf, in der schön grün gefärbten Flüssigkeit massenhaft grün gefärbte Körnchen	5 g Kotyledonen mit 10 ccm dest. Wasser zerrieben, 1:200 verdünnt. Der Niederschlag wurde 3—4 Stunden stehen [gelassen.
.. ..	0,4	schöne, opalescente Lösung ohne Stäubchen	
45prz. Alhoh.	0,4	schöne, grüne Lösung mit Flocken	
		sofort starke Trüb., nach einiger Zeit Flocken	
lest. Wasser	0,4	Niederschlag gelöst	
.. ..	0,4	Niederschlag nicht gelöst	
.. ..	9,4	Niederschlag nicht gelöst	
.. „	0,4	Lösung stark grün, keine Partikelchen, vollständig homogen	Am 8. XII, opalescent aber vollständig durchsichtige Flüssigkeit, kein Sediment.
.. „	0,4	ganz schwach gefärbte Flüssigkeit, feine dunkelgrüne Könchen	Mäßiges Sediment, stark gefärbte aber trübe Flüssigkeit.
.. ..	0,4	ganz schwach gefärbte Flüssigkeit, zahlreiche dunkelgrüne Körnchen. Hier scheint überhaupt nichts in Lösung gegangen zu sein, die schwach grüne Färbung scheint nur durch die grünen Körnchen vorgetäuscht zu sein	Am 8. XII. starkes Sediment, schwach grün gefärbte Flüssigkeit.
.. ..	0,4	schwach gelblich-grünliche Flüssigkeit, das Sediment geht nicht in Lösung über	
85prz. Kochs.	0,4	Lösung opaleszent, gelblich	Etiolierte Keimlinge.
95prz. Alkoh.	2	Lösung klar	
.. „	2	Der Alkohol färbt sich zunächst grün und enthält dunkelgrün gefärbte Körnchen, die sich beim Schütteln vollst. lösen, sodaß eine völlig klare, grüne Flüssigk. result.	
		Flüssigkeit grün gefärbt mit gröberen dunkelgrünen Körnern, die mit der Zeit den Farbstoff abgeben. In der grüngefärbten Flüssigkeit bleiben zahlreiche farblose, feine Flocken zurück, so daß die Lösung etwas trüb ist	
75prz. Alkoh.	2	kein Farbenunterschied, feine Flocken	1 g Laubbl. zerrieb. mit 9,5 ccm 75 proz. Alkoh.
95 .. „	2	kein deutlicher Unterschied	1 g Laubbl. zerr. m. 9,5 ccm 75 proz. Alkohol.
95	2	fast völlige Lösung, ganz spärliche feine Flocken. Nach dem Zentrifugieren ist die überstehende Flüssigkeit gleich gefärbt wie die beim nächsten Versuch. Spur weißes Sediment	1 g Laubbl. zerr. m. 9,5 ccm 95 proz. Alkohol.
75	2	dichte Flocken; nach deren Zentrifugieren ist die überstehende Flüssigkeit gleich gefärbt wie bei dem vorigen Versuche. Reichlicheres, gelblichgrünes Sediment	1 g Laubblätter gerieben m. 9,5 ccm 95 proz. Alkohol.
75	2	glatt gelöst	1 g Laubbl. zerr. mit 9.5 ccm 75 proz. Alkohol.
95 .. „	2	„ „	dgl.
95	2	„ „	1 g Laubbl. zerr. m. 9,5 ccm 95 proz. Alkohol.
75	2	sehr zahlreiche, weiße Flocken	dgl.
75 .. „	2	} Flocken, kein deutlicher Unterschied	
95 .. „	2		
95 .. „	2	vollständig gelöst	
75 .. „	2	Flocken	
dest. Wasser		Lösung stark opalescent	Trockene Laubblätter
0,85 prz. Ks.		Lösung klar	„ „

Tabelle XIII. Einfluß verschiedener

Datum 1921	Pflanze	Pflanzenorgane	Extraktionsmittel	Verw. Menge ccm	Zusatz	Pflanze	Pflanzenorgane
20. VI.	Gras	Blätter	95proz. Alkoh.	0,4			
	„	„	„ „	0,4			
	„	„	„ „	0,4			
	„	„	„ „	0,4			
	„	„	„ „	0,4			

Schließlich wäre noch zu erwähnen, daß der in alkoholischen Extrakten aus etiolierten Blättern von *Phaseolus multiflorus* durch Zusatz von 20fach verdünntem Pferdeserum hervorgerufene Niederschlag mit 0,85proz. Kochsalzlösung eine gelbliche, opalescente Lösung gibt.

Die Löslichkeitsverhältnisse der Eiweißchlorophyllverbindungen schienen uns auch geeignet, frühere Versuche, in denen beobachtet wurde, daß größere Wassermengen auf denselben alkoholischen Blattauszug weniger stark einwirken als kleinere, verständlich zu machen. Zum Studium dieser bemerkenswerten Erscheinung haben wir neuerliche Experimente gemacht (Tabelle XIII). Hierbei stellte sich in Übereinstimmung mit den früheren Untersuchungen heraus, daß für die Flockenbildung ein Optimum besteht, welches bei einem bestimmten Wasserzusatz erreicht wird. Kleinere Wassermengen wirken weniger stark fällend, bei Zusatz von größeren Quantitäten bleibt die Fällung innerhalb der Versuchszeit überhaupt aus und es tritt hier sofort eine deutliche, grünlichgelbliche Verfärbung auf.

Diese Erscheinung läßt sich nur dann verstehen, wenn man annimmt, daß das Chlorophyll in dem alkoholischen Blattauszuge mit gewissen, wenn auch nur geringen Eiweißmengen verbunden ist. Die letzteren wirken vermöge ihrer Wasserlöslichkeit als Schutzkolloid für das Chlorophyll und verhindern so dessen Ausflockung durch das Wasser.

Wir möchten an dieser Stelle auf andere, von uns bereits früher erwähnte Versuche hinweisen, in denen bei einzelnen Blattauszügen durch Zusatz sehr geringer, an sich nicht mehr fällender Eiweißmengen ein Ausbleiben der Veränderung des Chlorophylls durch Wasser beobachtet wurde, und die sich in gleicher Weise, nämlich durch eine Schutzwirkung des Eiweißes für das Chlorophyll, deuten lassen.

Während wir bei den eben besprochenen Versuchsreihen zu alkoholischen Chlorophyllösungen destilliertes Wasser in verschiedenen Mengen zugesetzt haben, haben wir bei anderen die Vorbehandlung des Blattes mit verschieden starkem Alkohol vorgenommen, wobei zu

Wassermengen auf die Reaktion.

ser	Verw. Menge ccm	Reaktion	Bemerkungen
ser	0,1	sofort θ, nach einigen Minuten klar, nach längerer Zeit leicht trüb, noch später Füll.	
„	0,2	sofort θ, nach einigen Minuten leicht trüb, nach längerer Zeit ziemlich stark trüb, noch später Fällung	
„	0,5	sofort θ, nach einigen Minuten leicht trüb, Lösung mit gelbem Ton, nach längerer Zeit leicht trüb, noch später leicht trüb	
„	0,5	nach längerer Zeit Spur trüb, am Abend leicht trüb	1 : 1 mit 95 proz. Alkohol verdünnt
„	0,2	am Abend Fällung	1 : 1 „ 95 „ „ „

berücksichtigen ist, daß der verwendete Alkohol durch den Wassergehalt des frischen Blattes bis zu einem gewissen Grade verdünnt wird (Tabelle XIV).

Wenn wir frische, oder getrocknete grüne Blätter mit 95 proz. Alkohol oder mit 75 proz. Alkohol behandelt haben, so erhielten wir die üblichen, schön grün gefärbten Lösungen, die letzteren waren jedoch lichter grün. Bei Benützung von 50 proz. Alkohol resultierten Extrakte, welche gelb gefärbt waren und daher keine merklichen Mengen des grünen Farbstoffes enthalten konnten, was sich übrigens auch aus dem Fehlen der Fluorescenz bei Beobachtung mittels Bogenlampe und Sammellinse zeigte. Dieser Befund stimmt mit der Angabe *Willstätters*[1]), der mit verdünntem Alkohol kein Chlorophyll aus dem Blatt extrahieren konnte,

Tabelle XIV. Farbe der aus grünen Blättern mit verschiedenen konzentrieitem Alkohol hergestellten Extrakte.

tum	Laubblätter von	Verw. Menge g	Extraktionsmittel	Verw. Menge ccm	Farbe des filtrierten Auszuges	Bemerkungen
.XII. 920	Phaseolus multiflorus		95 proz. Alkoh.		grün	Getrocknete Blätter
	„ „		75 „ „		„	„ „
	„ „		50 „ „		gelb, klar	„ „
	„ „		25 „ „		„ „	„ „
7.XII. 1920	. „		95 „ „		grün	Welke „
	„ „		75 „ „		„	„ „
	„ „		50 „ „		gelb, mit Spur grün	„ „
9. I. 1921	Peristrophe spinosa	0,5	95 „ „	9,5	dunkelgrün	Getrocknete „
	„ „	0,5	75 „ „	9,5	lichter „	„ „
	„ „	0,5	50 „ „	9,5	bräunlich-gelblich	„ „
	„ „	0,5	25 „ „	9,5	„ -rötlich	„ „
31.XII. 1920	Abutilon sp.		50 „ „		gelb m. Spur grünl. Stich	Frische „
26. I. 1921	Phaseolus multiflorus	0,5	95 „ „	9,5	grün, klar	
	„ „	0,5	75 „ „	9.5	„ „	
	„ „	0,5	50 „ „	9,5	gelb, „	
	„ „	0 5	25 „ „	9,5	gelblich-grünlich	

[1]) *R. Willstätter* und *A. Stoll*, l. c. 1913, S. 56.

überein. Wurden die Blätter mit 25 proz. Alkohol zerrieben, so haben wir in manchen Fällen gelbe, in anderen aber grünlich oder bräunlich gefärbte Flüssigkeiten erhalten.

Wenn man diese Versuche überblickt, so zeigt sich, daß die Beschaffenheit des Extraktionsmittels von ausschlaggebender Bedeutung für den Gehalt und Zustand des Blattfarbstoffes in der Lösung ist. Eine Erklärung dieser Erscheinung ist nach unserer Ansicht nur möglich, wenn die bei Besprechung unserer Fällungsreaktion gemachten Ausführungen berücksichtigt werden.

Wir haben nachweisen können, daß Chlorophyll durch Verbindung mit viel Eiweiß in Wasser löslich ist, und daß ein Überschuß von Chlorophyll geringe Eiweißmengen bis zu einem gewissen Grade in Alkohol überführen kann. Die Löslichkeit in Alkohol oder Wasser ist also bedingt durch das Mengenverhältnis in der Eiweiß-Chlorophyllverbindung und es ist ohne weiters verständlich, daß bei einer bestimmten Alkoholkonzentration, bei welcher weder die eine noch die andere Komponente gut löslich ist, es zu einem Ausfallen der Verbindung kommt. Auf diese Weise läßt sich erklären, daß bei Zusatz größerer Wassermengen zu alkoholischen Chlorophyllextrakten die Fällung des grünen Farbstoffes, welche durch kleinere Wassermengen hervorgerufen wird, ausbleibt, weil die Eiweißstoffe in dem zur Verfügung stehenden Wasser löslich sind und dadurch das Chlorophyll zwar nicht vor einer Dispersitätsänderung, aber wohl vor einer völligen Ausfällung schützen können.

Gleichzeitig läßt sich bei Zusatz von Wasser, besonders deutlich bei Verwendung größerer Wassermengen das Auftreten eines gelben Tones in dem grünen Blattauszuge beobachten. Wir vermuten, daß diese Erscheinung auf die Eigenschaft der gelben Pigmente der Chloroplasten, leichter in verdünnten Alkohol überzugehen als die grünen, zurückzuführen ist. Diese Eigenschaft zeigen ja unsere Versuche, in denen wir bei Behandlung von grünen Laubblättern mit 50 proz. Alkohol nur gelb gefärbte Extrakte erhielten.

Trotz dieser Löslichkeit der gelben Anteile des Chlorophylls in verdünntem Alkohol kommt es in mit 95 proz. Alkohol hergestellten Extrakten aus etiolierten Bohnenblättern bei Wasserzusatz zu einer Trübung und Fällung. Dieser scheinbare Widerspruch läßt sich nach unserer Ansicht dadurch erklären, daß die etiolierten Blätter ärmer an Eiweißstoffen sind als die grünen und daher bei Extraktion der ersteren mit 95 proz. Alkohol eine eiweißärmere Verbindung des gelben Farbstoffes resultiert als bei der Behandlung der grünen Blätter mit 50 proz. Alkohol; infolgedessen wird schon ein relativ geringer Wasserzusatz zum 95 proz. Alkohol eine Veränderung des Extraktes bewirken.

Nachdem wir nun das Wesen unserer Reaktion aufzuklären versucht und dabei gezeigt haben, daß es sich um eine Einwirkung von Ei-

weißstoffen auf Chlorophyll handelt, lag der Gedanke nahe, das Chlorophyll als Indicator für den Nachweis von Eiweiß zu verwenden. Unter günstigen Bedingungen läßt sich, wie aus unseren Versuchsprotokollen zu ersehen ist, bei Verwendung von Pferdeserum sogar noch ein Millionstel Gramm Eiweiß feststellen (Tabelle V).

Das Serum enthält Globuline und Albumine, also natives Eiweiß. Dieses erwies sich nach unseren Versuchen als bedeutend wirksamer als Eiweißabbauprodukte. Mit Rücksicht darauf ließ sich die Reaktion auch zu einer Differenzierung zwischen höheren und niederen Eiweißkörpern verwenden. An dieser Stelle sind Versuche zu erwähnen, bei denen wir das Vermögen von Auszügen aus reifen und unreifen Körnern von Gerste, in Chlorophyllextrakten Fällungen hervorzurufen, geprüft haben (Tabelle XV). In allen Fällen ergaben die Eiweißkörper aus reifen Körnern eine stärkere Reaktion als aus unreifen, was wohl durch den größeren Gehalt der ersteren an Proteinen und namentlich an solchen höherer Zusammensetzung bedingt ist.

f) Ähnlichkeit der wässerigen Eiweiß-Chlorophyllösung mit dem lebenden Blatte.

Wir haben nun unsere in der beschriebenen Weise hergestellten wässerigen Eiweiß-Chlorophyllösungen mit den Eigenschaften des Chlorophylls im Blatte verglichen.

Der durch Eiweißzusatz erhaltene Niederschlag im alkoholischen Blattauszuge enthält die grünen und gelben Komponenten des Chlorophylls, denn wird ein solcher eiweißreicher Niederschlag mit Alkohol versetzt, so erhält man eine grüne Lösung des Farbstoffes, welche beim Schütteln mit Benzol eine Trennung in den grünen und gelben Anteil ergibt.

Ob noch andere Stoffe in dem Niederschlage enthalten sind, haben wir vorläufig nicht geprüft.

Unsere Niederschläge stellen, wie aus den wiedergegebenen Versuchen anzunehmen ist, eine Adsorptionsverbindung zwischen Eiweiß und Chlorophyll dar.

Die spektroskopische Untersuchung der wässerigen Eiweiß-Chlorophyllösung, welche zum Teil im Wiener Radiuminstitut, zum Teil im serotherapeutischen Institut durchgeführt wurde, ergab das charakteristische Chlorophyllspektrum mit dem breiten Absorptionsstreifen im linken Teile des Spektrums; die anderen Bänder konnten wir gar nicht oder nur angedeutet sehen[1]). Durch direkte Untersuchungen

[1]) Bei den Eiweißchlorophyllösungen aus *Phaseolus vulgaris*- und *Sinapis arvensis*-Blättern war der Hauptabsorptionsstreifen, je nach der Dicke der Flüssigkeitsschichte zwischen 682—664, 717—640, 693—643, 697—661 μ, bei den lebenden Blättern zwischen 672—653, 665—645, 665—648 μ.

Tabelle XV. Einfluß von Auszügen aus reifen und unreifen Gersten-

Datum 1921	Pflanze	Pflanzen-organe	Extraktionsmittel	Verw. Menge ccm	Zusatz Pflanze	Pflanzen-organe
24. XI.	Phaseolus multiflorus	Laubblätter	95 proz. Alk.	0,4	Hordeum	Körner
	„ „	„	„ „	0,4	„	„
	„ „	„	„ „	0,4		
			„ „	0,4	„	„
	Daucus Carota	Wurzel	„ „	0,4		„
	„ „	„	„ „	0,4		„
	„ „		„ „	0,4		„
		„	„ „	0,4	„	„
	Phaseolus multiflorus		„ „	0,4		
	„ „	„	„ „	0,4	„	
	„ „	„	„ „	0,4	„	„
		„	„ „	0,4	„	„

Tabelle XVI. Photodynamische Wirkung von

Datum 1921	Aufschwemmung	Verw. Menge ccm	Zusatz Pflanzenpräparat	Extraktionsmittel, Lösungsmittel	Verw. Menge ccm
15. XII.	2 proz. gew. Kaninchenblut	1	Phaseolus multiflorus	95 proz. Alkohol	0,1
	2 „ „ „	1	„ „	destilliertes Wasser	0,2
	2 „ „ „	1	„ „	„ „	0,3
	2 „ „ „	1	Eiweiß-Chlorophyll aus	„ „	0,1
	2 „ „ „	1	Phaseolus multiflorus, Blätter	„ „	0,2
17. XII.	2 „ „ „	1	dgl.	„ „	0,1
	2 „ „ „	1	„	„ „	0,2
	2 „ „ „	1		„ „	0,1
	2 „ „ „	1		„ „	0,2

Tabelle XVII. Sauere und alkalische

5. VII. 1920.	0,5 ccm	Blutenblätter von	Sinapis arvensis,	extrahiert mit	dest. Wasser	+ 1 Tropfen
	0,5 „	„ „	Melilotus officinalis,	„ „	„ „ „	+ 1 „
	0,2 „	Laubblätter „	Sinapis arvensis,	„ „	95 proz. Alkohol	+ 0,4 ccm
	0,2 „	„ „	Melilotus officinalis	„ „	95 „ „	+ 0,4 „
	0,2 „	„ „	Sinapis arvensis,	„ „	95 „ „	+ 0,4 „
	0,2 „	„ „	Melilotus officinalis,	„ „	95 „ „	+ 0,4 „
5. XI. 1920.	1 „	Wurzel „	Phaseolus multiflorus	„ „	dest. Wasser	+ 1 Tropfen
		Nadeln „	Pinus nigra	„ „	95 proz. Alkohol	gegen Lack-
		Wedel „	Scolopendrium vulgare	„ „	95 „ „	

konnten wir, obzwar dieselben wiederholt und von verschiedenen Beobachtern vorgenommen wurden, keine ganz genauen Abgrenzungen der Bänder erzielen. *Willstätter*[1]) hat bei den Chlorophyllhydrosolen auch fast nur die Grenzen der Hauptabsorptionen in Rot und Violett

[1]) *R. Willstätter* und *A. Stoll*, l. c. 1918, S. 266, 267.

körnern u. Fruchtknoten auf Chlorophyll- u. andere Farbstofflösungen.

Extraktionsmittel	Verw. Menge ccm	Reaktion	Bemerkungen
dest. Wasser	0,1	sofort schwach trüb, nach einigen Minuten Flocken	0,5 g reife Körner zerrieben mit 10 ccm dest. Wasser, 100fach verdünnt
„ „	0,1	sofort θ, nach $^1/_4$ Stunde Spur trüb, nach ca. 40 Minuten Flocken	0,1 g unreife Körner zerrieben mit 2 ccm dest. Wasser, 100fach verdünnt
„ „	0,1	sofort θ, nach ca. $^1/_4$ Stunde θ	
„ „	0,1	nach einigen Minuten θ, nach $^1/_4$ Stunde feine Flocken	0,5 g reife Körner zerrieben mit 10 ccm dest. Wasser, 100fach verdünnt
„ „	0,1	sofort trüb, nach ca. 6 Minuten deutlich trüb, nach 10 Minuten feine Flocken	dgl.
„ „	0,1	sofort θ, nach ca. 6 Minuten Spur trüb	0,1 g unreife Körner zerrieben mit 2 ccm dest. Wasser, 100fach verdünnt
„ „	0,1	sofort θ, nach 6 Minuten θ	
„ „	0,1	nach 40 Minuten θ	dgl.
„ „	0,1	sof. θ, n. 5 Min. leicht, n. ca. 1 Std. stark trüb	
„ „	0,1	sofort θ, nach 5 Minuten trüb, nach ca. 1 Stunde feine Flocken	0,1 g unreife Körner zerrieben mit 2 ccm dest. Wasser, 200fach verdünnt
„ „	0,1	sof. trüb, nach 5 Min. sehr stark trüb, nach 10 Min. Flocken, n. ca. 1 Std. starke Flocken	0,5 g reife Körner zerrieben mit 10 ccm dest. Wasser, 200fach verdünnt
„ „	0,1	nach 10 Min. θ, nach ca. 1 Stunde feine Flocken	dgl.

Chlorophyll- und Eiweiß-Chlorophyll-Lösungen.

Wirkung		Bemerkungen
im Licht	im Dunkeln	
nach $1^1/_2$ Std. komplett gelöst	nach $1^1/_2$ Std. θ, n. 4 Std. im Brutschrank Spur Lyse, nach weit. 16 Std. bei Zimmertemp. starke Lyse	Trockene Laubblätter.
nach $1^1/_2$ Stunden partiell gelöst	nach $1^1/_2$, 4 und weiteren 16 Stunden θ	„ „
dgl.	dgl.	„ „
dgl.	dgl.	„ „
nach $1^1/_2$ Std. fast komplett gelöst	dgl.	„ „
nach 2 Stunden partiell gelöst		„ „ (Die verwend. Lös. stand seit dem 1. XII. im Zimmer im Licht).
nach 2 Std. fast komplett gelöst		dgl.
nach 2 Stunden θ		
nach 2 Stunden θ		

Reaktion der Pflanzensäfte.

Phenolphthalein	nach Zusatz von ca.	0,07 ccm	$^1/_{400}$	n. Natronlösung: Farbenumschlag
„	„ „ „ „	0,035 „	$^1/_{400}$	„ „
95 proz. Alkohol + 2 Tropfen Phenolphthal.	„ „ „ „	0,3 „	$^1/_{400}$	„ „
95 „ „ + 2 „ „	„ „ „ „	0,3 „	$^1/_{400}$	„ „
95 „ „ + 2 „ „	„ „ „ „	0,05 „	$^1/_{40}$	„ „
95 „ „ + 2 „ „	„ „ „ „	0,05 „	$^1/_{40}$	„ „
Phenolphthalein	„ „ „ „	0,1 „	$^1/_{100}$	„ „

aus neutral oder Spur sauer

stark hervortreten gesehen, während die übrigen Bänder geschwächt und diffus erschienen. Wie *Willstätter* können auch wir darauf hinweisen, daß diese Undeutlichkeit des Spektrums auch beim lebenden Blatt in der gleichen Weise wie bei den wässerigen Chlorophyllösungen festzustellen war.

Ähnliche Verhältnisse finden wir auch bei wässerigen chlorophyllhaltigen Blattauszügen, welche durch Zerreiben von Blättern mit destilliertem Wasser und Zentrifugieren hergestellt worden waren (Hauptabsorptionsstreifen zwischen 668—649 μ).

Läßt man einen starken Lichtstrahl durch die alkoholische Chlorophyllösung hindurchgehen, so kommt das Phänomen der Fluorescenz deutlich zum Vorschein; bei unseren kolloidalen Chlorophyllösungen haben wir, so wie beim Blatte, die Fluorescenz nicht wahrnehmen können. Wurden aber lebende Blätter und die kolloidalen Eiweiß-Chlorophyllösungen vor eine *Reichert*sche Fluorescenzeinrichtung gebracht, so trat bei beiden eine schöne Rotfärbung der belichteten Partien ein.

Mit diesem Befunde stehen Versuche in Zusammenhang, bei denen wir prüften, ob unseren Lösungen eine photodynamische Wirkung zukommt.

Zu 1 ccm einer $2^1/_2$ proz. Aufschwemmung von gewaschenem Kaninchenblut wurden verschiedene Mengen folgender Flüssigkeiten zugesetzt: Alkoholische Blattauszüge, wässerige Blattauszüge, wässerige Lösungen von Eiweiß-Chlorophyllniederschlägen (Tabelle XVI). In allen diesen Proben trat bei Belichtung Auflösung der roten Blutkörperchen ein. Die Kontrollen im Dunkeln blieben während der Versuchszeit ungelöst.

Eine Ähnlichkeit zwischen unseren Eiweiß-Chlorophyllösungen und dem lebenden Blatte besteht auch darin, daß erstere, die ebensowenig wie das Blatt bei gewöhnlicher Betrachtung Fluorescenz erkennen lassen, im durchfallenden Licht gleich den Blättern gelblichgrün, im auffallenden Licht grün, ohne den gelblichen Ton erscheinen (*Phaseolus vulgaris*, *Sinapis arvensis*).

Aus unseren Ausführungen geht also hervor, daß wässerige Lösungen von eiweißreichen Chlorophyllverbindungen gewisse gemeinsame Eigenschaften mit dem Chlorophyll in lebenden Blättern haben.

Zusammenfassung.

Werden mit 95 proz. Alkohol erzeugte Extrakte aus grünen Blättern in gewissen Mengenverhältnissen mit wässerigen Auszügen aus Blütenblättern derselben oder einer verschiedenen Pflanzenart zusammengebracht, so kommt es zunächst zu einer Trübung und später zu einer flockigen Fällung. Dieselbe Veränderung tritt durch den Zusatz wässeriger Extrakte aus Kotyledonen und Wurzeln sowie von tierischem Eiweiß (Pferdeserum) ein.

Reines Wasser erzeugt unter den gegebenen Versuchsbedingungen in den alkoholischen Lösungen schwächere Trübung und erst nach längerer Zeit geringe Flockenbildung.

Die Eiweißkoagulation in den wässerigen Auszügen durch reinen Alkohol tritt ebenfalls erst zu einer Zeit ein, zu der die beschriebene Reaktion bereits abgelaufen ist.

Untersuchungen über die Natur der an dem Fällungsprozesse beteiligten Körper haben ergeben, daß in den alkoholischen Extrakten der grüne Farbstoff, in den wässerigen die Eiweißstoffe in Betracht kommen.

Native Eiweißsubstanzen wirken viel stärker als Eiweißabbauprodukte.

Die Reaktion läßt sich nicht nur mit dem Rohchlorophyll, sondern auch mit dessen einzelnen Komponenten erzielen.

Die Flockbarkeit durch Eiweiß dürfte allen Pflanzenchlorophyllen zukommen und von ihrer Assimilationstätigkeit unabhängig sein.

Eine Fällungsreaktion mit Eiweiß geben auch alkoholische Lösungen von Anthocyan, nicht aber die von Pigmenten von *Bacillus prodigiosus* und *Bacillus violaceus*.

Alkoholische Hämatoporphyrinlösungen werden durch Wasser gefällt, dieser Prozeß wird durch Eiweiß gehemmt.

Alle untersuchten Pflanzenfarbstoffe, welche mit Eiweiß eine Flockung ergeben, haben die gemeinsame Eigenschaft, in ihren alkoholischen Lösungen durch Wasser eine Dispersitätsverminderung zu erfahren. Andererseits wird das Eiweiß der zugesetzten wässerigen Lösungen durch den Alkohol beeinflußt. Weiters kommt es zu einer Adsorptionsverbindung zwischen Eiweiß und Farbstoff, welche im gegebenen Medium ungünstige Lösungsbedingungen findet und daher ausfällt.

In anderen Medien gelingt es, die Eiweiß-Chlorophyllverbindung zu lösen und zwar ist dieses Resultat abhängig von ihrer Zusammensetzung. Enthält sie relativ viel Eiweiß, so ist sie wasserlöslich, ist sie eiweißarm, so läßt sie sich bis zu einem gewissen Grade in Alkohol überführen.

Durch die Wasserlöslichkeit der Eiweißkomponente, deren Gegenwart schon in dem alkoholischen Rohchlorophyllauszuge anzunehmen ist, wird verständlich, daß größere Mengen von Wasser das Chlorophyll des Blattauszuges weniger weit verändern als kleinere.

Wasserzusatz hat eine gelbliche Verfärbung der Chlorophyllextrakte zur Folge. Die mit 50 proz. Alkohol hergestellten Auszüge aus Blättern sind gelb gefärbt. Aus diesen Befunden ist auf eine bessere Löslichkeit der gelben Pigmente in verdünntem Alkohol im Vergleich zu den grünen zu schließen.

Durch die beschriebene Wirkung des Eiweißes auf das Chlorophyll lassen sich noch minimale Eiweißmengen (bis $^1/_{1000000}$ g) nachweisen.

Der durch Eiweißzusatz in alkoholischen Blattauszügen erhaltene Niederschlag lieferte mit 95 proz. Alkohol behandelt einen Extrakt,

der ebenso wie das aus Blättern mit Alkohol extrahierte Chlorophyll dessen grüne und gelbe Komponenten enthielt.

Die spektroskopische Untersuchung ergab sowohl bei den wässerigen Eiweiß-Chlorophyllösungen als auch beim lebenden Blatte den charakteristischen breiten Absorptionsstreifen im linken Teile des Spektrums, die anderen Bänder konnten entweder gar nicht oder nur angedeutet wahrgenommen werden.

Die wässerigen Eiweiß-Chlorophyllösungen (*Phaseolus vulgaris*, *Sinapis arvensis*) erscheinen gleich den lebenden Blättern im durchfallenden Licht gelblichgrün, im auffallenden grün, ohne gelblichen Ton.

Läßt man durch diese beiden Versuchsobjekte einen starken Lichtstrahl hindurchgehen, so ist keine Fluorescenz zu beobachten; dieselbe kommt aber bei beiden deutlich zum Vorschein, wenn man die kolloidalen Chlorophyllösungen und die lebenden Blätter vor eine *Reichert*sche Fluorescenzeinrichtung bringt.

Rote Blutkörperchen von Kaninchen werden durch wässerige Eiweiß-Chlorophyllösungen und wässerige Blattauszüge im Lichte gelöst.

Die durch Eiweiß in alkoholischen Blattextrakten erzeugten Niederschläge und deren wässerige Lösungen haben gewisse gemeinsame Eigenschaften mit dem Chlorophyll im lebenden Blatte.

Zur Lymphocyten-Lipase.

Von

S. Bergel.

(*Eingegangen am 31. März 1922.*)

Unter der Überschrift „Über die lipolytische Fähigkeit der weißen Blutkörperchen" machte *Nees* in Bd. 124, H. 1—6 dieser Zeitschrift Mitteilungen, die mir erst vor kurzem zu Gesicht kamen und die aus zwei Gründen einer sachlichen Entgegnung bedürfen; erstens, weil sie meine eigenen Veröffentlichungen, mit denen sich der Aufsatz vornehmlich beschäftigt, in einigen wesentlichen Punkten nicht richtig wiedergeben, und zweitens weil sie Anschauungen enthalten, die infolge mißverständlicher Deutung gewisser Befunde Verwirrung hervorzurufen imstande sind.

Zwar erkennt auch *Nees* die Hauptsache an, indem er sagt „die lipolytische Fähigkeit der Lymphocyten konnten wir durch unsere Versuche nur bestätigen", aber, da er sah, daß zuweilen auch leukocytenhaltiger Staphylokokken- und Streptokokkeneiter Fettspaltungsvermögen zeigte, so schloß er daraus, daß „es sich bezüglich des Fettspaltungsvermögens um eine allgemeine Zelleigenschaft handelt". Dieser Schluß ist nun ein irrtümlicher. Nach den Ausführungen von *Nees* muß es den Anschein erwecken, als ob es sich hierbei um einen neuen Befund handle, daß auch manche leukocytenhaltige Eiterarten Verdauungserscheinungen auf der Wachsplatte machen, und es ist mir nicht verständlich, wie *Nees* sagen kann, „dagegen habe er (sc. *Bergel*) bei rein leukocytärem, bei Staphylo- und Streptokokkeneiter nicht die geringsten Veränderungen der Wachsplatte wahrgenommen". Gerade im Gegenteil habe ich bereits in meiner ersten Publikation, die *Nees* auch zitiert, Münch. med. Wochenschr. 1909, Nr. 2, ausdrücklich hervorgehoben, „gewöhnlicher Kokkeneiter zeigte in vielen Fällen keine weiteren Veränderungen, er trocknete einfach an, in einigen anderen Fällen hingegen trat doch eine leichte oberflächliche Dellenbildung auf". Aus diesem Grunde bin ich auch der naheliegenden Versuchung, die Wachsplattenmethode etwa als differentialdiagnostisch für tuberkulösen Eiter zu verwerten, nicht erlegen, indem ich an derselben Stelle fortfuhr: „Ich möchte aber trotzdem vorläufig die genannten Veränderungen noch nicht für spezifisch gegenüber tuberkulösem Eiter hinstellen, da ja in etlichen Fällen auch anderer Eiter andeutungsweise ähnliche, wenn auch nicht so charakteristische Veränderungen hervorruft."

Der Grund, warum die Dellenbildung auf Wachsplatten nicht absolut charakteristisch für tuberkulösen, lymphocytenhaltigen Eiter ist, warum auch andere, leukocytenhaltige Eiterarten unter Umständen lipolytische Wirkungen hervorrufen, liegt aber ganz woanders, als *Nees* ihn sucht. Seine Schlußfolgerung, daß auch die polymorphkernigen Leukocyten ein fettspaltendes Ferment enthalten müssen, weil auch leukocytenhaltiger Eiter zuweilen lipolytisch wirkt, ist eine durchaus irrige. Der wahre Grund für den an sich richtigen Befund, daß oft auch leukocytenhaltiger Staphylo- und Streptokokkeneiter fettspaltende Eigenschaften

besitzt, ist der, daß nach den Untersuchungen *Neubergs* und seiner Mitarbeiter (Münch. med. Wochenschr. **1907**, Nr. 35) die von diesen Kokken produzierten Hämolysine, die aus den Filtraten der Bakterienkulturen gewonnen werden, sich als sogar stark lipolytisch erwiesen, und nicht die polymorphkernigen Leukocyten; daher findet sich auch oft im Serum Streptokokkenkranker eine Lipase, die aber gleichfalls nicht von den im Blute dieser Kranken befindlichen vermehrten Leukocyten herstammt, sondern die durch die Krankheitserreger selbst bedingt ist.

Wenn man polymorphkernige Leukocyten auf etwaige Lipolyse untersuchen will, so muß man, wie ich es getan habe, in der Brust- und Bauchhöhle Exsudate durch Aleuronat- oder Caseininjektionen erzeugen, die danach auftretenden massenhaften Leukocyten waschen, und auf Wachsplatten einwirken lassen. Dann erhält man keine Dellenbildung, dagegen bekommt man solche oft, wenn man Kulturen von hämolytischen Streptokokken auf Wachsplatten bei 52° bringt. Ein einziger Versuch, zumal bei 43°, wie ihn *Nees* anführt, ist wahrlich nicht maßgebend. Ich habe mich vergeblich bemüht, die Stelle zu finden, wo ich nach *Nees* gesagt haben soll, daß auch bei 43° „immer dieselben Veränderungen festzustellen gewesen seien".

Bereits in meiner ersten Veröffentlichung habe ich angegeben, daß ich Versuche angestellt habe mit Platten, die „ausgegossen waren mit einer Schicht von Stearin, Palmitin, weißem, gelbem Wachs und Kombinationen dieser Substanzen untereinander und zum Teil noch mit wasserfreiem Lanolin und Olein," wodurch der Schmelzpunkt ein niedrigerer wird. Ich kam zu dem Resultat, daß „als bestes Reagens für die Gruppe der festen Fette sich gelbes Wachs erwies", was ja schließlich auch *Nees* bestätigte mit den Worten: „Das reine Bienenwachs scheint das beste Material für die Experimente zu sein."

Wenn *Nees* die Beziehungen der fettspaltenden Lymphocyten zu den fetthaltigen Tuberkelbacillen ohne Angabe irgendwelcher Gegengründe glaubt anzweifeln zu können, Beziehungen, die schon aus den pathologisch-anatomischen Befunden und klinischen Erfahrungen sich ergeben, so verweise ich ihn auf meine diesbezüglichen experimentellen Arbeiten (Zeitschr. f. Tuberkul. **22**, H. 4. 1915 und **23**, H. 4. 1915 und Beitr. z. Klin. d. Tuberkul. **38**), die er offenbar noch nicht gelesen hat, in denen ich den direkten und zwingenden Nachweis des lipolytischen Abbaues der Fetthülle der Tuberkelbacillen innerhalb des Lymphocytenleibes erbringen konnte.

Die Bedeutung der Lymphocyten und ihrer Bildungsorgane, der Lymphdrüsen, als Abwehrreaktion des Körpers gegenüber den Tuberkelbacillen findet daher in biologisch-klinischer Beziehung immer mehr Bestätigung und Anerkennung.

Die Wasserstoffionenkonzentration und das Bacterium Coli.

I. Mitteilung.

Das Säurebildungsvermögen des Bacterium coli.

Von

Kurt Scheer.

(Aus der Universitäts-Kinderklinik Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 31. März 1922.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Bei der großen Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für alle von der Säurereaktion abhängigen vitalen Vorgänge ist es von Wichtigkeit, auch ihre Beziehungen zu den einzelnen Bakterienarten zu untersuchen, zumal dieses große Gebiet noch wenig durchforscht ist.

Besonders geeignet für solche Untersuchungen scheint mit Rücksicht auf die Gewinnung allgemein gültiger Gesetzmäßigkeiten gerade der Colibacillus zu sein, denn einesteils ist dieses Bacterium selbst ein starker Säurebildner, andererseits vermag es unter den verschiedensten äußeren Bedingungen zu leben, sowohl in der Außenwelt als auch innerhalb des Körpers in den einzelnen Darmabschnitten. Es muß sich also wechselnden Verhältnissen anpassen können und daher in verschiedenster Weise zur Säurereaktion seiner Umgebung in Beziehung treten.

Bei der Ausführung der vorliegenden Untersuchungen konnte eine Indikatorenmethode nicht verwendet werden, da die zu erreichende notwendige Genauigkeit in der Bestimmung der $[H^{\cdot}]$ sehr groß sein muß, wie unten zu ersehen ist, eine Bedingung, die auch durch die von *Michaelis* und *Gyemant*[1]) angegebene Methode, besonders in der hauptsächlich in Betracht kommenden Lage von $p_H = 4-5$, *nicht* zu erreichen ist.

Die Werte wurden deshalb durchweg durch Messung an der Gaskette[2]) bestimmt.

[1]) *Michaelis* und *Gyemant*, diese Zeitschr. **109**, 165. 1920.

[2]) Die Apparatur entspricht ungefähr dem von *L. Michaelis* angegebenen Modell. Statt Stöpselrheostaten wurde jedoch eine Kompensationsschaltung von Hartmann & Braun verwendet, die sich sehr bewährt und rasches Ablesen gestattet. Die Elektroden, von Kramer, Freiburg i. Br., besitzen teils Platindraht, teils Platinblech. Das Wasserstoffgas wurde elektrolytisch gewonnen.

Die Arbeit ist das Resultat von über 700 elektrometrischen Messungen; die Größe der Zahl erklärt sich dadurch, daß mit zahlreichen Stämmen in vielen Variationen und Kontrollen Bestimmungen gemacht werden mußten.

Über die Fähigkeit des Bacterium coli, Kohlehydrate zu spalten, und über die entstehenden Substanzen, hauptsächlich organische Säuren, ebenso darüber, welche Zuckerarten gespalten werden können und welche verschiedenen Endprodukte dabei entstehen, liegen überaus zahlreiche Untersuchungen vor; über dieses Arbeitsgebiet geben *Conradi* und *Bierast*[1]) eine übersichtliche Darstellung.

Ob das Gärungsvermögen der B. coli auf bakteriellen Enzymen beruht, ist noch nicht bewiesen, vielmehr nimmt *E. Kuhtz*[2]) an, daß die Zersetzung der Glucose lediglich der lebenden Zelle vorbehalten sei.

Über die Bestimmung der entstandenen Acidität durch Messung der [H˙] in der Nährflüssigkeit liegen bisher nur wenig Untersuchungen vor, und diese beziehen sich fast lediglich auf milchzuckerhaltige Flüssigkeiten.

Die ersten Untersuchungen stammen von *L. Michaelis* und *Marcora*[3]): sie stellen fest, daß das B. coli eine milchzuckerhaltige Nährflüssigkeit, gleichgültig ob der Ausgangspunkt mehr oder weniger alkalisch ist, bis zu einer $[H^\cdot] = 1 \cdot 10^{-5}$ als Endwert anzusäuern vermag. Diese Bestimmungen wurden allerdings nur mit einem Colistamm vorgenommen.

Die Befunde wurden von *M. Clark*[4]) nachgeprüft und bestätigt, er fand den Endwert zwischen $p_H = 4{,}75$ bis 5,16. Die gleichen Werte fand auch *van Dam*[5]) bei gelegentlicher Nachprüfung, und ebenso fand ich[6]) bei früheren Untersuchungen mit 3 Colistämmen den Endwert zwischen $p_H = 4{,}86$ und 5,16. Es liegen also bisher nur vereinzelte Bestimmungen vor.

Für eine exakte Untersuchung der Frage des Säurebildungsvermögens war es jedoch notwendig, systematische Messungen der [H˙] vorzunehmen, einesteils unter Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Säurebildung, dann vor allem unter Berücksichtigung verschiedener Colistämme[7]) und dann auch mit Verwendung verschiedener Zuckerarten.

---

[1]) *Conradi* und *Bierast*, Handbuch Kolle-Wassermann, II. Aufl., 1913, Bd. VI, S. 488ff.

[2]) *E. Kuhtz*, Arch. f. Hyg. **58**, 125. 1906.

[3]) *L. Michaelis* und *Marcora*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. **14**. 1912.

[4]) *M. Clark*, Journ. of biol. chem. **22**, 87ff. 1915.

[5]) *van Dam*, diese Zeitschr. **87**, 107ff. 1918.

[6]) *Scheer*. Zeitschr. f. Kinderheilk. **29**. 1921.

[7]) Die Colistämme wurden liebenswürdigerweise teils von Herrn Geh. Rat Prof. *Neisser*, Frankfurt a. M., teils von Prof. *Nissle*, Freiburg i. Br., zur Verfügung gestellt.

Da vermutlich auch die Stärke der Pufferung des Mediums einen Einfluß auf die Höhe der zu erreichenden [H˙] ausübt, wurde, um diesen Faktor auszuschließen, als Kulturmedium eine Flüssigkeit von gleichem und verhältnismäßig schwachem Pufferungsvermögen in Form von Nährbouillon gewählt.

Die zu untersuchende Zuckerart wurde als 5 proz. Zusatz beigefügt. Die Beimpfung geschah jeweils durch eine Öse einer zwei Tage alten Schrägagarkultur eines Colistammes. Der ursprüngliche Säuregrad der Bouillon selbst schwankte zwischen p_H = 6,70—7,39. Die Kulturen blieben während der Zeit der Versuche dauernd im Brutschrank.

Zunächst wurde der zeitliche Verlauf der Säurebildung in 5 proz. *Milchzucker*bouillon untersucht.

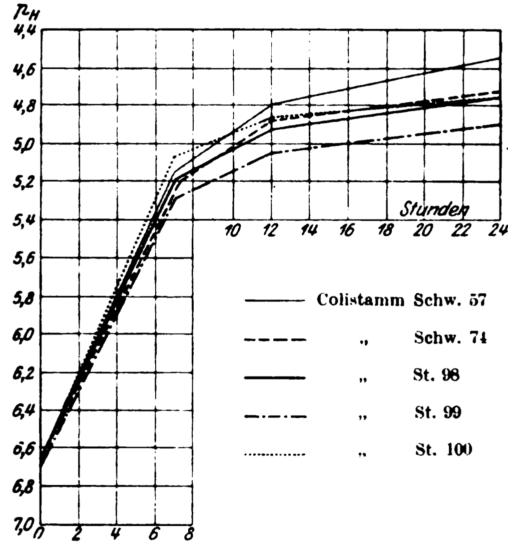


Abb. 1. Säurebildung in 5 proz. Milchzuckerbouillon.

Tabelle I.

5 proz. Milchzuckerbouillon (Ausgangswert p_H = 7,19) mit 2 Tage alten Colikulturen beimpft.

Stamm *)	p_H nach 4 Std.	p_H nach 10 Std.	p_H nach 27 Std.	p_H nach 51 Std.
Schw. 1	5,74	5,14	4,85	4,79
„ 2	5,83	5,09	4,74	4,68
„ 3	5,85	5,09	4,68	4,61
„ 4	6,10	5,07	4,68	4,64
„ 5	6,02	5,03	4,66	4,64
„ 6	6,07	5,10	4,81	4,78
„ 7	6,66	5,17	4,71	4,69
„ 8	6,29	5,14	4,78	4,66
„ 9	5,86	5,19	4,78	4,74
St. 101	6,66	5,21	4,79	4,85
Mal II	5,50	4,86	4,64	4,66
„ III	5,51	4,81	4,71	4,66
„ IV	5,87	5,05	4,85	4,86

*) Schw. 1 = schwacher Eigenstamm *Fürst*; 2 = schwacher Eigenstamm *Seidt*; 3 = schwacher Eigenstamm *Lentz*; 4 = schwacher Eigenstamm *Kussow*; 5 = geschwächter Behandlungsstamm *Pfeiffer*; 6 = schwacher Eigenstamm *Lentz*; 7 = geschwächter Behandlungsstamm *Duve*; 8 = geschwächter Behandlungsstamm *Erk*; 9 = schwacher Eigenstamm *Fetzer*.

Dementsprechend wurden in Abständen von einigen Stunden fortlaufend die [H˙] bestimmt; die bei den verschiedenen Stämmen erhaltenen Werte sind aus der Kurve und Tabelle I ersichtlich.

Die Werte in der Kurve und in der Tabelle I stimmen überein. Aus beiden ergibt sich, daß bei Verwendung von Milchzucker für alle untersuchten 18 Colistämme die Säureentwicklung ganz gleichmäßig, kaum graphisch dargestellt, in annähernd parallelverlaufenden sich fast deckenden Kurven, vor sich geht.

Nach 10 Stunden ist die stärkste Säurebildung bis ca. $p_H = 5$ schon erreicht, die [H˙] steigt dann nur noch langsam weiter und erreicht nach 24 Stunden eine $p_H =$ von ca. 4,7, der auch nach weiteren 24 Stunden nur minimal überschritten wird.

Es wird also nach 24 Stunden von allen Colibacillen in milchzuckerhaltigen Nährböden ein Säuerungsendwert von $p_H = 4{,}7$ ([H˙] $= 2 \cdot 10^{-5}$) erreicht, der auch weiter beibehalten wird.

Über die Bedeutung dieses Befundes wird später noch zu sprechen sein.

Traubenzucker.

In einigen Versuchen fand *M. Clark* (l.c.) bei Verwendung von Dextrose anscheinend höhere Werte der [H˙] als bei Lactose. Um dies nachzuprüfen, wurden vergleichende Untersuchungen mit 5 proz. Traubenzuckerbouillon und 5 proz. Milchzuckerbouillon vorgenommen. Die Nährböden wurden ebenfalls mit 2 Tage alten Colischrägagarkulturen beimpft und nach 25 Stunden der p_H gemessen.

Tabelle II.

Colistämme	5% Traubenzucker p_H nach 25 Std.	5% Milchzucker p_H nach 25 Std.
Schw. 57	4,52	4,73
„ 74	4,51	4,90
St. 98	4,51	4,83
„ 99	4,59	4,92
„ 100	4,49	4,83
Mal II	4,47	4,71
„ III	4,47	4,77
„ IV	4,68	4,94

Daraus ergibt sich deutlich, daß bei Traubenzucker regelmäßig von allen Stämmen eine $p_H = 4{,}5$ erreicht wird, also gegenüber dem Milchzucker ein um 0,2—0,3 p_H niederer Wert.

Die Prüfung auch verschiedener anderer Zuckerarten (5% in Bouillon) ergibt die aus Tabelle III ersichtlichen Werte.

Tabelle III.

Colistamm	Rohrzucker		Trauben-Zucker	Fruchtzucker		Milch-Zucker	Galaktose		Malzzucker			Mannit	
	24 Std.	48 Std.	24 Std.	24 Std.	48 Std.	24 Std.	24 Std.	48 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.	24 Std.	48 Std.
Schw. 57	4,52	—	4,46	4,83	4,61	4,70	4,82	—	5,05	—	4,75	5,29	4,97
„ 74	4,57	—	4,63	4,99	4,69	4,90	5,26	5,0	5,14	4,89	4,70	5,29	5,12
St. 98	4,52	—	4,51	4,70	4,52	4,88	5,02	—	4,86	—	4,75	4,79	4,57
„ 99	4,64	4,51	4,51	4,75	4,52	4,85	4,92	4,74	4,97	—	—	4,49	4,32
„ 100	4,66	—	4,61	4,83	4,57	4,88	4,75	4,61	4,95	—	—	5,38	5,12
Mal II	4,50	–	4,53	4,58	4,54	4,77	5,14	4,73	4,85	—	—	5,41	5,44
„ III	4,52	4,42	4,54	4,54	4,54	4,88	4,77	4,57	4,93	—	—	6,20	5,53
„ IV	4,64	—	4,70	4,71	4,62	4,94	4,85	4,69	4,93	4,75	—	5,62	5,60
Durchschn.	4,57	—	4,56	4,74	—	4,85	4,90	—	4,96	—	—	5,31	—

Bei den verschiedenen Zuckerarten ist also der Säuerungsendwert verschieden hoch, am höchsten bei Rohrzucker ($p_H = 4{,}57$) und Traubenzucker (4,56), etwas niedriger bei Lävulose (4,74), und dann kommt erst Milchzucker (4,85), Malzzucker (4,96). Galaktose und Mannit endlich ergeben schwankende Werte, weil sie von den einzelnen Stämmen mit verschiedener Geschwindigkeit zerlegt werden; wie aus den Messungen nach 48 und 72 Stunden hervorgeht, pflegen die [H˙] noch anzusteigen, besonders bei den schwer zersetzbaren wie Mannit. Das Bemerkenswerte ist, daß für verschiedene Zuckerarten die Endwerte verschieden sind, und daß Traubenzucker den höchsten Endwert hat. Der Säuerungsendwert wird also durch die Art des Zuckers unverkennbar beeinflußt, was wohl durch die bei den einzelnen Kohlenhydraten entstehenden verschiedenen Arten von organischen Säuren in wechselndem Verhältnis zueinander bedingt wird. Dagegen differieren die Endwerte bei den einzelnen Colistämmen verhältnismäßig nur wenig. Bei einer bestimmten Zuckerart ist daher für die verschiedenen Colistämme der Säuerungsendwert eine annähernd konstante und für das Bact. coli eine charakteristische Größe.

Diese Eigenschaft des Colibacillus ist mit Rücksicht auf sonstige Besonderheiten der einzelnen Stämme interessant, so z. B. auf den antagonistischen Index. Nach *Nissle*[1]) haben bestimmte Colirassen ein verschieden starkes Wucherungsvermögen. Dies wird dadurch geprüft, daß in eine 7 Stunden alte Typhusbouillonkultur der zu untersuchende Colistamm eingeimpft und nach weiteren 14 Stunden durch Aussaat auf Endoagarplatte nachgeprüft wird, welcher von beiden Stämmen auf der Platte vorherrscht. Hat der Colibacillus den Typhus überwuchert, so wird er als starker Stamm bezeichnet, herrschen dagegen die Typhuskolonien vor, so handelt es sich um einen schwachen Colistamm.

[1]) *Nissle*, Dtsch. med. Wochenschr. 1916, Nr. 39.

Es liegt nahe, anzunehmen, daß bei diesem Phänomen die Aciditätsverhältnisse eine Rolle spielen. Nach den Untersuchungen von *Bruenn*[1]) wird der Typhusbacillus bereits bei einer $[H^{\cdot}] = 1 \cdot 10^{-5}$ innerhalb 24 Stunden abgetötet, die von den Colibacillen gebildete Acidität von $p_H = 4{,}7$ reicht also leicht aus, um die Typhusbacillen abzutöten.

Nissle (l. c.) und *Langer*[2]) haben allerdings mittels titrimetrischer Methoden diese Frage schon untersucht und gefunden, daß mit der Säurebildung nicht das Wucherungsvermögen der Coli zusammenhängt.

Für die Entscheidung erschien jedoch von Wichtigkeit, festzustellen, ob die Colistämme mit verschiedenem antagonistischen Index einmal eine verschieden rasche Säurebildungsfähigkeit besäßen oder ob ihr Säuerungsendwert verschieden sei je nach ihrem Wucherungsvermögen.

Auf Kurve 1 und Tabelle I sind nun bei Stämmen von verschiedenem Index[3]) die $[H^{\cdot}]$ gemessen. Die mit St. gezeichneten (98, 99, 100, 101) haben einen starken, die mit Schw. gezeichneten (57, 74, 1—9) einen schwachen Index, also geringes Wucherungsvermögen. Unter den schwachen sind teils Eigenstämme, teils geschwächte Behandlungsstämme; näher auf die Eigenheiten dieser Stämme einzugehen, hat jedoch keinen Zweck, denn aus den Zahlen ergibt sich, daß keinerlei Unterschied, weder in der zeitlichen Säurebildung der Stämme, noch im Endwert besteht. Schwache Stämme (wie 57, 3) haben sogar einen etwas höheren Endwert als ausgesprochen starke Stämme wie 98, 99, 100. Danach kann also die Eigenschaft des antagonistischen Indexes beim Bact. coli nicht mit dem Säurebildungsvermögen in Beziehung gebracht werden.

Auch bezüglich der Malachitgrünfestigkeit gewisser Colistämme war es naheliegend, eine Verschiedenheit in der Säurebildung verantwortlich zu machen. Malachitgrün wirkt bekanntlich hemmend auf Colibacillen, eine Eigenschaft, die mit der Säurebildung der Colibacillen in Zusammenhang gebracht wird.

Im Gegensatz hierzu sind einige Colistämme malachitgrünfest. Bei 3 solchen Stämmen[4]) (Mal. II, III u. IV) wurden deshalb auch die $[H^{\cdot}]$ bestimmt. Wie aus den Zahlen auf Tabelle II, III und IV hervorgeht, entsprechen sie jedoch den bei den anderen Colistämmen in jeder Beziehung.

Es zeigt sich also, daß auch die Malachitgrünfestigkeit bestimmter Colistämme nicht mit ihrer Fähigkeit der Säurebildung zusammenhängt.

---

[1]) *Bruenn*, Inaug.-Diss. Berlin 1913.
[2]) *Langer*, Dtsch. med. Wochenschr. 1917, Nr. 42, S. 1317.
[3]) Von Prof. *Nissle* geprüfte, überlassene Stämme.
[4]) Von Geh. Rat Prof. *M. Neisser* gütigst überlassen.

Bouillon ohne Zuckerzusatz.

Die [H˙] der zuckerfreien gewöhnlichen Nährbouillon wird auch durch Coli verändert, wie Tabelle IV zeigt. Die Bouillon wurde durch verschieden starken Zusatz von $^{n}/_{10}$-HCl oder $^{n}/_{10}$-NaOH in ihrer [H˙] verändert, sterilisiert und dann mit Coli Nr. 100 beimpft. Der p_H wurde sofort, nach 24, 72 und 92 Stunden bestimmt. Nach 42 Stunden wurde auch das Wachstum der Coli auf Endoagar geprüft.

Tabelle IV.

10 ccm Bouillon	sofort p_H	Coliwachstum auf Endoagar nach 42 Std.	p_H nach 42 Std.	p_H nach 72 Std.	p_H nach 92 Std.
+ 6 ccm $^{n}/_{10}$-HCl	2,52	θ	2,57	– – –	– – –
+ 5 ccm $^{n}/_{10}$-HCl	3,02	θ	3,02		– – –
+ 4 ccm $^{n}/_{10}$-HCl	3,44	θ	3,46	– – –	– –
+ 3 ccm $^{n}/_{10}$-HCl	3,91	θ	3,98	– – –	– –
+ 2 ccm $^{n}/_{10}$-HCl	4,70	–	5,91	7,60	8,08
+ 1 ccm $^{n}/_{10}$-HCl	5,79	– –	6,79	7,90	8,42
+ 0 ccm $^{n}/_{10}$-HCl	7,13	– –	7,61	8,30	– – –
+ 1 ccm $^{n}/_{10}$-NaOH	7,77	– –	8,32	8.52	– –
+ 2 ccm $^{n}/_{10}$-NaOH	9,34	– –	8,13	8,40	– – –

Danach verändert also Coli die [H˙] in einer zuckerfreien Bouillon, gleichgültig wie hoch der Ausgangspunkt ist, wenn nur Coli darin bestehen kann, wahrscheinlich durch Produktion von Eiweißspaltprodukten derart, daß im Verlauf einiger Tage eine p_H = ca. 8,0—8,6, also eine Alkalisierung eintritt.

Übrigens hat auch bei der zuckerhaltigen Bouillon die Anfangs-[H˙] keinen wesentlichen Einfluß, wie schon *Michaelis* und *Marcora* gezeigt haben, und auch Tabelle VIII und IX erkennen lassen.

Tabelle V.

5 proz. Milchzucker + $^{n}/_{10}$-NaOH mit Coli Nr. 100 beimpft.

10 ccm Bouillon +	Anfangs-p_H	p_H nach 48 Std.	Wachstum auf Endoagar
1,2 $^{n}/_{10}$-NaOH	8,65	4,81	–
1,4 $^{n}/_{10}$-NaOH	8,76	4.82	–
1,6 $^{n}/_{10}$-NaOH	8,91	4,81	–
1,8 $^{n}/_{10}$-NaOH	8.93	4,88	–
2,0 $^{n}/_{10}$-NaOH	9,28	4,86	–

Auch bei verschieden stark alkalischem Nährboden wird der gleiche Säuerungsendwert p_H = 4,86 erreicht.

Anders jedoch, wenn die Bouillon einen Zusatz von Milchsäure enthält. Darauf hat zuerst *Clark* hingewiesen, der in einigen Versuchen fand, daß durch Zusatz von geringen Mengen Milchsäure der Säuerungs-

endwert etwas herabgesetzt wird. Er betont, daß der Endwert der [H˙] niedriger gefunden wird, je nachdem die Pufferwirkung der Nährflüssigkeit stärker wird, und weist daraufhin, daß vielleicht die nicht dissoziierten Säuren neben der [H˙] ein wenig toxisch wirken.

Diese Angaben prüfte *van Dam* in einem Versuch mit Molke nach, der ebenfalls ergab, daß der Endwert durch Zusatz von Natriumlactat etwas verringert wird.

Zu dieser Frage stellte ich folgende Untersuchungen an: Milchzucker- resp. traubenzuckerhaltige Bouillon wurde teils mit Milchsäure, teils mit Essigsäure versetzt und dann mit Coli Nr. 100 beimpft. Nach 3 Tagen wurde die [H˙] bestimmt und das Wachstum auf Endoagar geprüft.

Tabelle VI.

5 proz. Milchzuckerbouillon + n-Milchsäure.

10 ccm Bouillon +	p_H sofort	Nach 3 Tagen	Wachstum auf Endoagar
0 ccm n-Milchsäure	6,58	4,75	+
0,05 ccm „	5,48	4,75	+
0,10 ccm „	5,70	4,87	+
0,15 ccm „	5,55	5,28	+
0,20 ccm „	5,25	5,04	+
0,25 ccm „	5,32	5,02	+
0,30 ccm „	4,89	4,64	θ
0,35 ccm „	4,62	4,52	θ

Tabelle VII.

10 ccm Bouillon +	p_H sofort	p_H nach 3 Tagen	Endoagar nach 3 Tagen
0 ccm n-Essigsäure	6,73	4,64	+
0,05 ccm „	6,45	4,74	+
0,10 ccm „	5,94	4,81	+
0,15 ccm „	5,34	4,86	+
0,20 ccm „	5,05	4,95	+
0,25 ccm „	4,98	5,10	+
0,30 ccm „	4,85	4,86	θ
0,35 ccm „	4,32	4,79	θ
0,40 ccm „	4,57	4,48	θ

Die beiden Tabellen zeigen, daß bei steigendem Zusatz von Milchsäure und Essigsäure der nach 3 Tagen jeweils erreichte Endwert immer niedriger wird, und zwar bis zu dem Punkt, wo die erreichte [H˙] mit der ursprünglichen der angesäuerten Bouillon übereinstimmt, wo sich also in den Tabellen die Werte beider Stäbe kreuzen. Dieser Punkt trifft auch ungefähr mit derjenigen [H˙] zusammen, die so stark ist, daß sie von vornherein bactericid wirkt und daher keine Bakterientätigkeit aufkommen läßt. Danach sinkt der Endwert bei steigendem

Säurezusatz so lange, bis die angesäuerte Bouillon von vornherein eine bakterientötende [H˙] hat.

Dieses Verhalten tritt besonders deutlich bei dem Versuch mit Essigsäure hervor, so daß es sich wohl um eine Gesetzmäßigkeit handeln dürfte.

Entsprechende Werte aber in der hierfür charakteristischen Höhe erhält man auch, wenn statt Milchzucker Traubenzucker verwendet wird. Die diesbezüglichen Tabellen bleiben aus Platzmangel weg.

Dieses Phänomen tritt jedoch nicht ein bei Verwendung von Salzsäure, wie Tabellen VIII und IX zeigen.

Tabelle VIII.

5 proz. Milchzuckerbouillon + $^{n}/_{10}$-HCl beimpft mit Coli Nr. 100.

10 ccm Bouillon +	p_H sofort	p_H nach 48 Std.	Wachstum auf Endoagar nach 48 Std.
0 ccm $^{n}/_{10}$-HCl . . .	7,11	4,83	+
1 ccm $^{n}/_{10}$-HCl . . .	5,74	4,71	+
2 ccm $^{n}/_{10}$-HCl . . .	4,70	4,68	+
3 ccm $^{n}/_{10}$-HCl . . .	4,06	4,08	θ
4 ccm $^{n}/_{10}$-HCl . . .	3,51	3,53	θ

Tabelle IX.

5 proz. Traubenzuckerbouillon + $^{n}/_{10}$-HCl beimpft mit Coli Nr. 100.

10 ccm Bouillon +	p_H sofort	p_H nach 48 Std.	Wachstum auf Endoagar nach 48 Std.
0 ccm $^{n}/_{10}$-HCl . . .	6,74	4,40	+
1 ccm $^{n}/_{10}$-HCl . . .	5,59	4,44	+
2 ccm $^{n}/_{10}$-HCl . . .	4,61	4,47	+
3 ccm $^{n}/_{10}$-HCl . . .	3,94	4,01	θ
4 ccm $^{n}/_{10}$-HCl . . .	3,55	3,41	θ

Nach den Tabellen VIII und IX beeinflußt also die Veränderung der [H˙] der Nährflüssigkeit auch nach der saueren Seite zu an und für sich den durch Coli bewirkten Endwert nicht. Dieser letztere wird vielmehr nur durch Milchsäure resp. Essigsäure verändert.

Der Zusatz von Lactaten resp. Acetaten bewirkt wohl die Zurückdrängung der Dissoziation der Milchsäure; die Konzentration der nichtdissoziierten Molekel wird vermehrt und dadurch vielleicht eine hemmende Wirkung auf die Bakterientätigkeit ausgeübt. Wenn der Zusatz so stark ist, daß die dadurch bewirkte [H˙] schon dem normalen Endwert 4,7 gleichkommt, so findet überhaupt keine Säurebildung mehr statt, diese unterbleibt natürlich erst recht, wenn durch den Säurezusatz eine Anfangs-p_H erreicht wird, die an sich auf Coli bactericid wirkt, also $p_H = 4,6$ und höher. Es besteht wohl die Ansicht von *Clark*

und *van Dam* zu Recht, daß der durch Coli in zuckerhaltigen Nährböden erreichte Endwert nicht allein durch die [H˙] an sich bestimmt wird, sondern daß er auch durch die undissoziierten Säuren beeinflußt wird.

Zusammenfassung.

Die bei der Säuerung zuckerhaltiger gleich gepufferter Nährflüssigkeit (Bouillon) durch Bact. coli entstehende [H˙] steigt in den ersten 10 Stunden bis $p_H = 5$, nimmt dann nur noch ganz wenig zu und erreicht nach 1—2 Tagen einen Säuerungsendwert.

Dieses Verhalten ist für alle untersuchten Colistämme bezüglich Geschwindigkeit und Endwert ungefähr der gleiche und kann nicht in Zusammenhang gebracht werden mit anderen charakteristischen Eigenschaften, wie dem antagonistischen Index nach *Nissle* und der Malachitgrünfestigkeit mancher Colistämme.

Der erreichte Säuerungsendwert ist annähernd unabhängig von der Art der untersuchten menschlichen Colistämme und von der Anfangs-[H˙] der Nährbouillon. Dagegen wird der Endwert beeinflußt von der Art des Zuckers. Für jede Zuckerart hat er eine bestimmte Größe, z. B. für den Milchzucker ca. $p_H = 4,7$, für Traubenzucker ca. 4,5. Für eine bestimmte Zuckerart ist er aber konstant und stellt eine für den Colibacillus charakteristische Größe dar.

Der Endwert wird außerdem beeinflußt, und zwar herabgesetzt durch Zusatz von Milchsäure resp. Essigsäure, und zwar solange die dadurch veränderte Ausgangs-[H˙] den Endwert nicht von vornherein erreicht oder überschreitet.

Die Wasserstoffionenkonzentration und das Bacterium Coli.

II. Mitteilung.

Die bactericide Wirkung bestimmter H-Ionenkonzentrationen auf das Bacterium Coli.

Von

Kurt Scheer.

(Aus der Universitäts-Kinderklinik Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 31. März 1922.)

In der vorhergehenden Arbeit wurden die Gesetzmäßigkeiten behandelt, unter denen die durch das Bact. coli bewirkte Säurebildung vor sich geht.

Eine weitere Frage von Bedeutung ist die, im Bereich welcher [H˙] das Bact. coli zu existieren vermag, resp. bei welchem p_H es abgetötet wird.

Brünn[1]) stellte Untersuchungen mit Acetatgemischen, deren [H˙] rechnerisch ermittelt wurde, an. Er fand, daß bei Säuren, deren Alkalisalze an sich nicht bactericid wirken, nur die [H˙] für die bakterientötende Wirkung entscheidend ist, und er fand, daß Coli bei einer [H˙] = ca. $2 \cdot 10^{-5}$ innerhalb 24 Stunden abgetötet wird.

In früheren Versuchen bestimmte ich[2]) nun ebenfalls mit Acetatgemischen, deren [H˙] an der Gaskette gemessen wurde, welche [H˙] in kürzerer Zeit bactericid wirken. Die mit Coli beimpften Gemische wurden hierbei im Brutschrank gehalten und von ihnen in bestimmten zeitlichen Abständen Abstriche auf Endoagar gemacht. Es ergaben sich folgende Werte:

Coli wurde abgetötet innerhalb	3	Stunden	durch	$p_H = 3{,}77$
,,	6	,,	,,	$p_H = 4{,}00$
,,	9	,,	,,	$p_H = 4{,}36$
,,	12	,,	,,	$p_H = 4{,}50$
,,	24	,,	,,	$p_H = 4{,}62$.

Diese Ergebnisse wurden nachgeprüft in Bouillon, die mit steigenden Mengen von $^n/_{10}$-HCl angesäuert war und mit Coli St. 100 beimpft wurde.

---

1) *Brünn*, Inaug.-Diss., Berlin 1913.

2) *Scheer*, Arch. f. Kinderheilk. **69**. 1921; Zeitschr. f. Kinderheilk. **29**. 1921.

Tabelle I.

10 ccm Bouillon +	p_H sofort	p_H nach 24 Std.	Wachstum auf Endoagar nach				
			8 Std.	6 Std.	9 Std.	12 Std.	24 Std.
1,0 n/10 HCl	5,61	6,67	+	+	+	+	—
1,5 n/10 HCl	4,97	5,47	+	+	+	+	—
1,8 n/10 HCl	4,68	4,90	+	+	—	—	—
2,0 n/10 HCl	4,56	4,63	+	+	+	+	—
2,2 n/10 HCl	4,44	4,58	+	+	+	+	θ
2,4 n/10 HCl	4,22	4,23	+	+	+	+	θ
2,6 n/10 HCl	4,18	4,27	+	+	+	θ	θ
2,8 n/10 HCl	4,15	4,22	—	+	+	θ	θ
3,0 n/10 HCl	3,99	3,99	+	+	+	θ	θ
3,2 n/10 HCl	3,87	3,86	—	+	θ	θ	θ
3,4 n/10 HCl	3,75	3,80	+	+	θ	θ	θ
3,6 n/10 HCl	3,68	3,74	+	θ	θ	θ	θ
3,8 n/10 HCl	3,70	3,68	+	θ	θ	θ	θ
4,0 n/10 HCl	3,43	3,46	+	θ	θ	θ	θ
5,0 n/10 HCl	3,15	—	θ	θ	θ	θ	θ

Danach wurde also abgetötet Coli in

3	Stunden durch	$p_H = 3,15$
6	„ „	$p_H = 3,68$
9	„ „	$p_H = 3,87$
12	„ „	$p_H = 4,22$
24	„ „	$p_H = 4,58$

Im allgemeinen sind die Werte der [H˙] danach zwar etwas höher, aber derjenige für 24 Stunden stimmt genau mit dem früheren Ergebnis überein, und bestätigt auch *Brünns* Befunde.

Die Colibacillen werden also durch eine $p_H = 4,6$ innerhalb 24 Stunden abgetötet. *L. Michaelis*[1]) nimmt auf Grund seiner Versuche mit *Marcora* an, daß die Säurebildung bei Coli bis zu $p_H = 5$ fortschreitet, und daß das Bacterium bei $p_H = 4,7$ sicher abgetötet wird; er erblickt hierin „eine bemerkenswerte automatische Regulationsvorrichtung, die auch für die Gewebe der höheren Organismen zur Geltung kommen dürfte. Die Wirksamkeit der milchsäurebildenden Agentien hänge von der [H˙] der Lösung ab und sei derart, daß bei $[H^\cdot] = 2 \cdot 10^{-5}$ eine weitere Milchsäurebildung nicht stattfinden könne. Hierdurch schützten sich die Organismen vor der Bildung schädlicher Säuremengen."

Aus der Tabelle III der vorhergehenden Arbeit geht aber hervor, daß in einem traubenzuckerhaltigen Nährboden die Colibakterien bis zu einem $p_H = 4,5$ und höher zu säuern vermögen, also die Grenze überschreiten, bei der sie, wie wir oben gesehen haben, abgetötet werden.

In der Tat werden sie auch durch die selbst erzeugte [H˙] abgetötet, wie sich durch kulturelle Prüfung der Bouillonkulturen leicht zeigen läßt. Eine solche tägliche Untersuchung ergibt, daß beimpfte Trauben-

[1]) *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration. Springer 1914.

zuckerbouillon, allerdings nicht schon nach 24 Stunden, aber nach 4 bis 5 Tagen steril ist.

Am 8. II. 1921 wurden 5proz. Traubenzuckerbouillonröhrchen mit Coli St. 100 beimpft:

Nach 2 Tagen	$p_H = 4{,}54$,	auf Endoagar		+
„ 3 „	$p_H = 4{,}44$	„	„	—
„ 4 „		„	„	+
„ 5 „	$p_H = 4{,}42$	„	„	—

Nach 5 Tagen hat sich die Kultur also selbst sterilisiert.

Daß es sich hierbei wohl hauptsächlich um die Wirkung der [H˙], vielleicht auch um die der nicht dissociierten Säure handelt, jedoch nicht um sonstige toxische Produkte, zeigt einmal der Erfolg der Wiederbeimpfung.

Eines der selbst steril gewordenen Röhrchen wird wieder mit dem gleichen Stamm beimpft, nach 2 Tagen ist auch diese Kultur wieder steril ($p_H = 4{,}46$). Ein anderes Röhrchen wird zuvor mit NaOH bis zum Phenolphthaleinneutralpunkt neutralisiert und dann wieder beimpft:

Nach 2 Tagen	$p_H = 4{,}85$,	Endoagar	+ +
„ 3 „	$p_H = 4{,}77$	„	+
„ 5 „		„	θ

Die vorgenommene Alkalisierung vermochte die Abtötung um 3 Tage weiter hinauszuschieben.

Daß diese bactericide Wirkung der selbstgebildeten Säure auch für die anderen Colistämme gilt, zeigt folgende Tabelle.

Tabelle II.

5proz. Traubenzuckerbouillon mit verschiedenen Colistämmen beimpft, nach 5 Tagen wird p_H gemessen und das Wachstum durch Ausstreichen einer Öse auf Endoagar geprüft.

Colistamm	p_H nach 5 Tagen	Wachstum auf Endoagar nach 5 Tagen
Schw. 57	4,42	θ
„ 74	4,91	+
St. 98	4,56	θ
„ 99	4,45	θ
„ 100	4,52	θ
Mal. II	4,42	θ
„ III	4,40	θ
„ IV	4,59	θ

Die Stämme haben also eine $p_H = 4{,}40$—$4{,}60$ erreicht und sich selbst abgetötet, nur der Stamm 74, der nur eine $p_H = 4{,}91$ erreichte, lebte noch und zeigte auch bei gelegentlicher Nachprüfung nach weiteren 7 Tagen noch ein üppiges Wachstum.

Einen Beweis, daß die erreichte p_H bei der Selbststerilisierung das Entscheidende ist, bietet auch folgender Versuch, wobei verschiedene Zuckerarten verwendet und infolgedessen verschiedene Endwerte erreicht wurden.

Tabelle III.

Bouillonröhrchen mit 5proz. Zuckerzusätzen wurden mit Coli Nr. 100 beimpft. Nach 5 Tagen p_H und Wachstum geprüft.

Zuckerart	p_H nach 5 Tagen	Wachstum auf Endoagar
Traubenzucker	4.54	θ
Glycose (anderes Präparat)	4.59	θ
Galaktose	4.63	+
Lävulose	4.70	+
Mannit	4.73	+
Milchzucker	4.89	·
Malzzucker	4.89	–

Der erreichten [H˙] des Endwertes entsprechend ist auch die Abtötung resp. die Hemmung erfolgt.

Aber auch die in Milchsäure erreichte [H˙] reicht hin, um die Kultur abzutöten, allerdings erst nach längerer Zeit, in 7 Tagen. Bei Wiederbeimpfung einer solchen selbststerilisierten Bouillon stirbt die neue Kultur in 3 Tagen ab, durch vorherige Neutralisierung der Bouillon kann sie allerdings für längere Zeit geschützt werden.

Im Gegensatz hierzu kann in nicht zuckerhaltiger Bouillon die Colibacillenkultur viele Wochen lang am Leben bleiben.

Nach diesen Untersuchungen kann also die Theorie eines Regulationsmechanismus (*L. Michaelis*), wodurch die Colibacillen nicht mehr Säure produzieren können, als ihnen eben noch zuträglich ist, *nicht aufrechterhalten* werden, vielmehr steht fest, daß durch die Bacillen bei bestimmter Zuckerart eine [H˙] erreicht wird, die sie selbst innerhalb bestimmter Zeit abtötet.

Nach der alkalischen Seite zu wurde ebenfalls die Grenze der Lebensfähigkeit für das Bact. coli bestimmt.

Als Nährmedium wurde zuerst Bouillon verwendet, die mit wechselnden Mengen von $^n/_{10}$-NaOH alkalisiert war und dann mit Coli Nr. 100 beimpft wurde. In einer anderen Versuchsanordnung wurden Puffergemische von tertiärem und sekundärem Natriumphosphat verwendet, die ebenfalls mit Coli Nr. 100 beimpft wurden. Die Ergebnisse stimmen ungefähr überein, deshalb mögen nur die Ergebnisse bei den Phosphatgemischen angeführt sein. Nach dem Vorschlag von *L. Michaelis*[1]) wurden Gemische aus sekundärem und tertiärem Natriumphosphat hergestellt, an der Gaskette gemessen und dann mit Coli Nr. 100 beimpft.

[1]) Die Wasserstoffionenkonzentration, Springer 1914, S. 189.

Die Röhrchen blieben im Brutschrank, in Abständen von einigen Stunden wurde dann wie früher auf Endoagar überimpft.

Tabelle IV.

p_H des Phosphatgemisches	Wachstum auf Endoargar nach				
	3 Std.	6 Std.	9 Std.	12 Std.	24 Std.
7,74	+	+	+	+	+
9,32	+	+	+	+	+
9,43	+	+	+	θ	θ
9,65	θ	θ	θ	θ	θ
9,85	θ	θ	θ	θ	θ

Danach werden also die Colibacillen durch

eine p_H = 9,65 in 3 Stunden abgetötet
„ p_H = 9,43 „ 12 „ „
„ p_H = 9,32 hat keine bactericiden Eigenschaften mehr.

Die Existenzmöglichkeit für Coli liegt also zwischen p_H 9,3 und 4,8, also ganz gleichmäßig um den Neutralitätspunkt verteilt, und zwar in einer ganz auffallenden Breite, entsprechend den wechselnden äußeren Bedingungen, unter denen die Coli zu leben vermögen.

Zusammenfassung.

Das Bact. coli wird innerhalb bestimmter Zeiten durch bestimmte H-Ionenkonzentrationen abgetötet; innerhalb 24 Stunden nach der sauren Seite zu durch p_H = 4,6, nach der alkalischen Seite zu durch p_H = 9,4.

Die bactericid wirkende p_H = 4,6 wird bei der Säurebildung in zuckerhaltigen Nährflüssigkeiten durch das Bact. coli sogar selbst erreicht und teilweise überschritten, so daß die Bacillen innerhalb einer gewissen Zeit sich selbst abtöten. Danach besteht also ein bisher angenommener Regulationsmechanismus, der Bact. coli vor Säurebildung bis zu schädlicher [H˙] schützen soll, nicht.

Zur Kenntnis der Gärungsbeschleunigungen.

Von

Hans v. Euler und Signe Karlsson.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 1. April 1922.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die beiden Gruppen der Biokatalysatoren B der Hefe.

In zwei vorhergehenden Mitteilungen von *Euler* und *Myrbäck*[1]) wurde der Versuch gemacht, die wasserlöslichen Biokatalysatoren der Hefe dadurch ihrer Menge nach zu bestimmen, daß einerseits der getrockneten Hefe durch Auswaschen alle löslichen Biokatalysatoren entzogen wurden, andererseits ermittelt wurde, durch welche Mengen dieser Biokatalysatoren das ausgewaschene Präparat auf die Hälfte der normalen Gärwirkung gebracht werden konnte. Ferner wurde im Anschluß an die Arbeit von *Tholin*[2]) versucht, unter diesen Biokatalysatoren eine Fraktionierung durch Erhitzen zu erreichen.

Es ist schon früher von einem von uns hervorgehoben worden, daß es nicht angängig ist, die gärungsbeschleunigende Wirkung des Hefenextraktes ohne weiteres den B-Vitaminen (akzessorischen Nahrungsstoffen, Nutraminen usw.) zuzuschreiben, wie dies von mehreren Seiten geschehen ist. Ohne uns hier auf eine Kritik dieser Arbeiten einzulassen, wollen wir in der vorliegenden Mitteilung aus unserem experimentellen Material ein Ergebnis hervorheben, welches vielleicht geeignet ist, bei der dringend notwendig werdenden Bearbeitung der in der Literatur immer wachsenden Menge von Versuchszahlen klärend zu wirken.

Es ist durch die klassischen Versuche von *Harden* und *Young*[3]) bekannt, daß getrockneter Hefe durch Behandlung mit Wasser das Co-Enzym entzogen werden kann, und daß eine solche Hefe Zymohexosen nicht mehr angreift, wohl aber diese Fähigkeit wieder erlangt durch Zusatz der Waschwässer, also des vorher entzogenen Co-Enzyms.

---

[1]) *Euler* und *Myrbäck*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **115**, 155. 1921; **117**, 28. 1921.

[2]) *Th. Tholin*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **115**, 235. 1921.

[3]) *Harden* und *Young*, Proc. of the roy. soc. of London B **78**—**82**. 1906—1910; Biochem. Journ. **7**, 214. 1913; **8**, 100. 1914.

Die zweite wesentliche Entdeckung, welche hier zu erwähnen ist, verdankt man *Neuberg*[1]). Dieser Forscher hat bekanntlich 1911 gezeigt, daß ausgewaschene Hefe, welche nicht mehr imstande ist, Zymohexosen zu vergären, Ketosäuren, besonders Brenztraubensäure in Acetaldehyd und Kohlensäure zerlegt. Durch die sich daran anschließenden Untersuchungen von *Neuberg* ist dann der nahe Zusammenhang des hierbei wirksamen, von *Neuberg* Karboxylase genannten Katalysators zum Zymasekomplex deutlich zutage getreten.

Nach *Neuberg* können wir somit die Wirksamkeit wenigstens einer wichtigen Komponente der Co-enzymfreien Zymase am Substrat Brenztraubensäure quantitativ charakterisieren; wir kommen hierauf bald eingehender zurück. Durch die Gegenwart des Co-Enzyms wird die Carboxylasewirkung höchstens unwesentlich beeinflußt, was sich aus Vergleichen der Carboxylasegärung gegebener Hefenrassen im ausgewaschenen und nicht ausgewaschenen Zustand zeigt.

Wir können also für je ein und dieselbe Hefe die Carboxylasewirkung und die Gärwirkung quantitativ vergleichen, indem wir einerseits für die Brenztraubensäurespaltung, andererseits für die Glucosegärung die Reaktionskonstanten[2]) oder besser die Zeiten der halben Reaktion angeben. Für jede Hefe erhält man nach der unter gewissen Vorsichtsmaßregeln vorgenommenen Trocknung ein gewisses Normalverhältnis der beiden Geschwindigkeiten. Wir wollen dasselbe künftig als N (*Neuberg-Quotienten*) bezeichnen. Diese Verhältniszahl

$$N = \frac{\text{Reaktionsgeschw. d. Glucosegärung}}{\text{Reaktionsgeschw. d. Brenztraubensäuregärung}}$$

ist nun bedingt durch die Mitwirkung der in der Hefe vorhandenen verschiedenen Aktivatoren. Der Brenztraubensäurezerfall kann allerdings durch verschiedene Zusätze bekannter Stoffe etwas beschleunigt werden, die größten Veränderungen von N werden aber durch Hemmungen bzw. Aktivierungen der Glucosegärung hervorgerufen.

Was wir nun in dieser kurzen Mitteilung hervorheben wollen, ist der Umstand, daß es bis jetzt trotz zahlreicher Versuche *nicht gelungen ist,* durch irgendeinen der aus tierischem oder pflanzlichem Material extrahierbaren Stoffe, die man nach der gegenwärtigen Nomenklatur zu den Vitaminen rechnet, *das Co-Enzym der Hefe zu ersetzen.* Vielmehr muß dem eigentlichen Enzymkomplex eine gewisse Menge Co-Enzym zugesetzt werden, um eine weitere Aktivierung durch ein „Vitamin" zu erzielen.

Demnach haben wir unter den Biokatalysatoren B zwei wesentlich verschiedene Substanzen zu unterscheiden:

---

[1]) *Neuberg* und *Karczag*, diese Zeitschr. **36**, 68. 1911, sowie die Mitteilungen „Über zuckerfreie Hefegärung" in dieser Zeitschrift.

[2]) Siehe hierzu auch *Euler* u. *Löwenhamn*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **97**, 279; 1916. — *Euler*, Sv. Vet. Akad. Archiv f. Kemi Bd. 8, März 1922.

1. Diejenige, evtl. diejenigen, welche ausgewaschene Trockenhefe, die an sich nur auf Ketosäuren wirksam ist, gegenüber Hexosen (in Gegenwart von Phosphat) wirksam machen. Bis jetzt ist nur das *Harden*sche Co-Enzym bekannt; über die Wirkung des Muskelsaftes sind die Versuche noch nicht abgeschlossen. Sollten sich weitere Stoffe von den gleichen Eigenschaften ergeben, so sind diese unter Anschluß an die *Harden*sche Namengebung geeignet als Muskel-Co-Enzyme usw. zu bezeichnen.

2. Die Biokatalysatoren unbekannter Zusammensetzung aus Säften, Zellen oder Geweben, welche die Zymohexosengärung ausgewaschener Hefen nur in Gegenwart von Co-Enzym (und Phosphat) bewirken. Hierher gehören die Biokatalysatoren der Weizenkeimlinge, der Citronen und anderer Früchte, die B-Stoffe der Milch, des Serums usw.[1]).

3. Chemisch bekannte Aktivatoren wie Zymophosphat, Salze vieler organischer Säuren und zahlreiche andere Stoffe. Diese Wirkungen sind in letzter Zeit besonders von *Neuberg* und seinen Mitarbeitern[2]) eingehend untersucht worden.

Daß keiner der unter 3 genannten Aktivatoren[3]), besonders Zymophosphat bei der alkoholischen Hexosegärung das Co-Enzym ersetzen kann, ist von *Harden* und *Young* festgestellt worden. Vitamine und ihre aktivierenden Wirkungen sind damals noch nicht bekannt gewesen.

Die quantitative Charakterisierung der Gärungskomponenten einer Hefe wird also noch etwas komplizierter, und der frühere Vorschlag von *Euler* und *Myrbäck* (l. c.) zur Bestimmung von Einheiten der Aktivierung muß dementsprechend modifiziert werden, indem wir streng zwischen den beiden genannten Gruppen der früher als Biokatalysatoren zusammengefaßten Stoffe unterscheiden müssen. Eine gewisse Trennung gelingt durch die von *Tholin* angewandte Methode der fraktionierten Erhitzung, aber diese Methode ist nicht ganz einfach, und die Reindarstellung des Co-Enzyms erscheint dadurch als eine Aufgabe von erhöhter Bedeutung. Zur Gewinnung des erforderlichen Ausgangsmateriales haben wir zunächst den gleichen Weg eingeschlagen, welcher bei der Isolierung der Saccharase nicht ohne Erfolg gewesen ist, nämlich die quantitative Untersuchung verschiedener Heferassen hinsichtlich der darin enthaltenen Co-Enzymmengen. Als wesentlichstes Resultat

---

[1]) Siehe hierzu die zahlreichen Arbeiten amerikanischer Forscher, sowie auch von *Abderhalden* und seinen Mitarbeitern, *Fermentf.* 1—5; 1915—1921.

[2]) *C. Neuberg*, Sitzungsber. d. preuß. Akad. d. Wiss. Mai 1918; ferner diese Zeitschr. Mitteilungen über chemisch definierte Stimulatoren der alkoholischen Gärung, 9. Abhandl., 1918—1921.

[3]) Einen partiellen Ersatz, dessen Art eine weitere Untersuchung verdient, haben *Neuberg* u. *Schwenk* (Diese Zeitschr. **71**, 135; 1915) durch Pyruvinat erhalten; siehe hierzu auch *Harden*, Biochem. Journ. **11**, 64. 1917.

hat sich hierbei besonders durch die Versuche von *K. Myrbäck* ergeben, daß in dieser Hinsicht zwischen Oberhefe und Unterhefe erhebliche Unterschiede bestehen.

Während nämlich aus getrockneter *Unter*hefe das Co-Enzym durch Wasser ohne größere Schwierigkeiten *so vollständig ausgezogen werden kann*, daß die Gärwirkung des Rückstandes höchstens der Selbstgärung der Hefe entspricht, ist ein solches Herauslösen des Co-Enzyms bei den von uns bis jetzt untersuchten *Oberhefen nicht* möglich gewesen. Der getrockneten Hefe kann zwar ein Teil ihres Co-Enzyms, aber — ohne weitere Vorbehandlung — bei weitem nicht die gesamte Menge dieses Stoffes mittels Wasser (oder Alkohol) entzogen werden.

Versuche.

I.

Zur Charakterisierung der ausgewaschenen Hefe mittels Brenztraubensäure nach *Neuberg* war es zunächst erforderlich, den Zusammenhang zwischen Spaltungsgeschwindigkeit und Acidität in der gleichen Weise festzustellen, wie dies früher bezüglich der Zymophosphatgärung durch *Euler* und *Heintze* geschehen war. Die Kinetik der *Neuberg*schen Reaktion:

$$CH_3 \cdot CO \cdot COOH \rightarrow CH_3 \cdot CHO + CO_2$$

bedarf noch in mancher Hinsicht der Aufklärung. Wir wollen aber in diesem Zusammenhang nicht auf diesen Punkt eingehen, sondern, die Gärversuche zusammenfassend durch die Kurve der Abb. 1 einfach die Anzahl Kubikzentimeter CO_2 angeben, welche aus einer gegebenen pufferhaltigen Lösung durch 1 g ausgewaschene Unterhefe H innerhalb 30 Minuten entwickelt werden.

Die Zusammensetzung der Lösung war folgende:

5 ccm 5 proz. Pyruvinatlösung
30 ccm 4 proz. Phosphatlösung als Puffer
Wassser
50 ccm. Dazu 1 g ausgewaschene Hefe.

Versuch 1.

p_H		Spaltungsdauer in Minuten							
Anfangs	nach 6 Std.	5	11	23	43	63	103	183	373
3,67	4,57	1,5	2,0	2,0	2,2	2,2	2,2	2,2	2,5
4,29	5,38	5,5	8,0	9,0	9,5	10,0	10,0	10,5	11,0
4,66	5,47	6,5	8,5	9,3	9,8	10,5	11,2	—	—
6.03	6,23	2,5	3,5	4,5	4,8	5,0	5,3	5,5	5,5

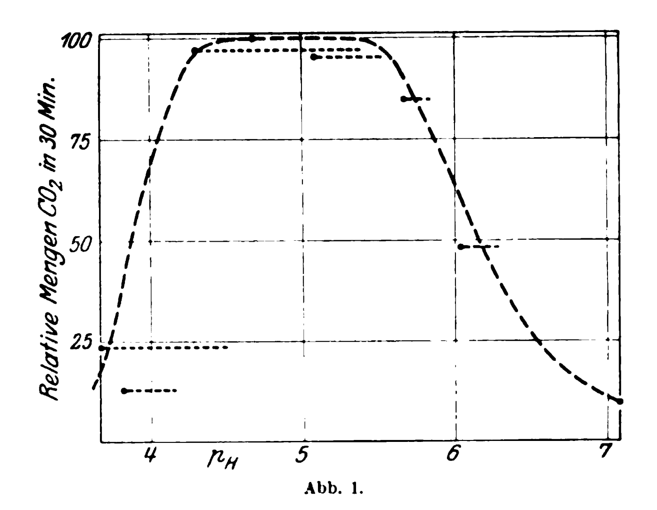


Abb. 1.

Versuch 2.

p_H		Spaltungsdauer in Minuten				
Anfangs	nach 6 Std.	5	10	22	30	110
3.84	4.14	1,0	1.0	1,0	1,0	1,0
5.06	5,54	6,0	7,5	8,5	9,0	9,5
5,64	5.84	5,8	7,0	7,8	8,0	8,5
7,10	7.10	0,5	0,7	0,7	0,8	1,2

II.

Unter den Versuchen, welche die *Unabhängigkeit* der Geschwindigkeit der Brenztraubensäurespaltung vom Co-Enzym zeigen, sei als Beispiel nur folgender angeführt[1]):

5 ccm Na-Pyruvinatlösung, 5 proz.
30 ccm Phosphatlösung, 4 proz.
Wasser
50 ccm Lösung. Darin 0,5 g Trockenhefe.

Hefe	Spaltungsdauer in Minuten	
	40	120
Nicht ausgewaschen . . .	12,0	16,5
	12.0	16,0
Ausgewaschen	14,0	17,0
	14,0	16,5

III.

Als Beispiel für das typische Verhalten des Co-Enzyms sowie der Biokatalysatoren B gegenüber ausgewaschener Hefe sei folgende Ver-

[1]) Siehe hierzu auch *Neuberg*, diese Zeitschr. **51, 141. 1913.**

suchsreihe angegeben, welche mit je 1 g der ausgewaschenen Hefe ausgeführt ist. Siehe hierzu Abb. 2; die Nummern der Kurven beziehen sich auf folgende Tabelle.

Jede Versuchslösung enthält wie oben angegeben, 30 ccm Phosphatlösung als Puffer; das Gesamtvolumen ist 50 ccm. Glucosemenge: 2 g.

Wie aus dieser Versuchsreihe so ging auch aus zahlreichen anderen übereinstimmend folgendes hervor:

Säfte und Extrakte von starker B-Vitaminwirkung aktivieren ausgewaschene Trockenhefe ohne Co-Enzym nicht (Versuch 2—4). *Erst*

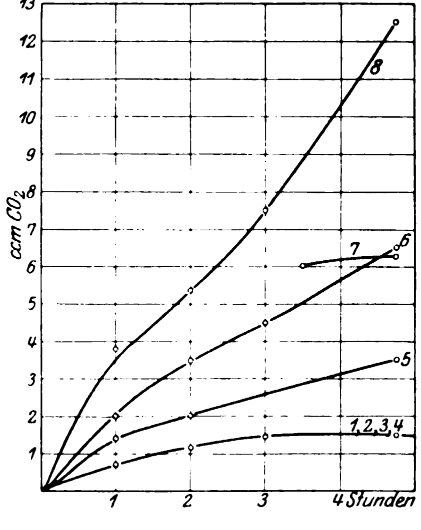


Abb. 2.

Nr.		Gärungsdauer in Minuten					
		60	120	180	285	300	465
1	A. Ohne Zusatz	0.5	1,0	1,1	1,25	1,5	—
2	B. Biokatalysatoren (Vitamine): B-Vitamine aus 10 ccm Kuhmilch	0,8	1,5	1.5	—	2.0	—
3	3 ccm Citronensaft . . .	0,8	1,0	1,0	1,3	1,5	—
4	10 ccm Extrakt von Malzkeimlingen	—	1,0	1,0	1,0	1,0	—
5	C. 5 ccm Hefenextrakt (Co-Enzym)	1.5	2.0	—	3.5	-	15.0
6	D. Co-Enzym + Vitamine: 10 ccm Muttermilch . .	2,0	3,5	4.5	6.5	—	15,5
7	5 ccm Citronenensaft . .	—	—	6.0	6,4	—	—
8	10 ccm Urin (Säugling) .	3,8	5.3	7.5	12,5	-	-

bei Gegenwart von Co-Enzym wird die Gärung ausgewaschener Trockenhefe durch Lösungen von B-Stoffen beschleunigt, und zwar stark[1]) (bis zu 200%).

[1]) Bei dieser Gelegenheit mag bemerkt werden, daß die Fehlergrenzen hinsichtlich der Gärungsgeschwindigkeit erheblich größer sind, als gewöhnlich angenommen wird. Die mittleren Abweichungen schätzen wir (bei Anwendung der gleichen Hefen-Präparate) etwa 5%; wenn bei ausgewaschener Trockenhefe die CO_2-Entwicklung weniger als 5—10 ccm beträgt, können die Abweichungen einzelner Versuchsreihen bis 30% ausmachen. Aktivierungen, welche in diese Fehlergrenzen fallen, geben wir nicht an.

Beiträge zur Kenntnis der Gallensekretion.

II. Mitteilung.

Von

Ernst Neubauer.

(Aus der 1. medizinischen Klinik in Wien.)

(Eingegangen am 3. April 1922.)

Mit 1 Abbildung im Text.

I.

Die Angaben über die Wirkung verschiedener Stoffe auf die Größe der Gallensekretion stehen vielfach untereinander in denkbar größtem Widerspruche. Wenn von einem Körper behauptet wurde, er rege die Gallensekretion an, so läßt sich fast ausnahmslos die Feststellung eines anderen Untersuchers nachweisen, daß dieser Körper ohne Wirkung auf die Gallenabscheidung ist, und nicht selten die eines dritten, der fand, daß eben diese Substanz die Gallensekretion herabsetzt. Diese Verwirrung stiftende Fülle einander widersprechender Befunde hat ihren Grund zum Teil darin, daß bei der Versuchsanordnung nicht darauf Rücksicht genommen wurde, daß für die Fragestellung eine strenge Scheidung zwischen einer Wirkung auf die Gallensekretion und auf die Gallenexkretion unbedingt erforderlich ist, zum Teil sicher auch in der Wahl des Versuchstieres: Hunde mit permanenter Gallenfistel geben unter gleichen äußeren Bedingungen sehr verschiedene, knickungsreiche Gallenausscheidungskurven. Nur hinsichtlich eines Körpers sind die Untersucher seit *Hupperts*[1]) und *Schiffs*[2]) Beobachtungen in bezug auf seine Wirkung auf die Gallensekretion einig: Die Galle und ihre charakteristischen Bestandteile, die gallensauren Salze, wirken cholagog.

Es schien am zweckmäßigsten, Untersuchungen über experimentelle Beeinflussung der Gallensekretion mit einem derart sichergestellten

---

[1]) Arch. d. Heilk. **5**, 236. 1864.

[2]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **3**, 598. 1870. — Siehe auch *A. Socoloff*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **11**, 166. 1875; *Rosencranz*, Würzburger Verhandlungen, N. F. **13**, 218. 1879; *H. Paschkis*, Wien. med. Jahrb. 1884, S. 59; *Prevost* und *Binet*, Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences **106**, 1690. 1888; *Doyon* und *Dufourt*, Arch. de phys. V. **9**, 562. 1897; *Pfaff* und *Balch*, Journ. of exp. med. **2**, 49. 1897; *Winogradow*, Engelmanns Arch. f. Physiol. 1908, S. 313.

Cholagogum wie Galle, glykochol-, taurochol- und cholsaurem Natrium durchzuführen, nachdem Versuche mit Körpern, die in ihrem chemischen Bau oder ihrem physikalischen Verhalten Ähnlichkeiten mit den Gallensäuren aufweisen, keine Steigerung der Gallensekretionsgröße ergeben hatten. So wurden denn zunächst eine Anzahl von Gallensäuren und Gallensäureabkömmlingen, die früheren Untersuchern nicht oder in wenig reinem Zustand zur Verfügung gestanden hatten, meist in Form ihrer Natriumsalze auf ihre galletreibende Wirkung untersucht. Versuchstiere waren Kaninchen, deren besondere Brauchbarkeit für Gallenabsonderungsversuche in einer früheren Mitteilung[1]) betont wurde; hinsichtlich der Fütterung, Narkose, Versuchsanordnung und Gallenverarbeitung sei auf diese Mitteilung verwiesen.

In der folgenden Übersicht ist nur die Wirkung auf die in bestimmten Zeiträumen abgeschiedene Gallenmenge dargestellt. Für jeden untersuchten Körper folgt meist je ein gekürztes Beispiel aus einer größeren Versuchsreihe; in einigen Beispielen ist die Wirkung verschiedener Substanzen bei demselben Tier angeführt, um Verschiedenheiten der Wirkungsgröße zu verdeutlichen. Die Injektion erfolgte in die Jugularvene. Wenn nicht anders angegeben, wurde die Gallensäure als Natriumsalz gegeben.

Versuch 14: Kaninchen, 2500 g. Nach einer Vorperiode Injektion von Kaninchenlebereigengalle.

Zahl der in je 1 Minute ↓ 2 ccm Eigengalle ↓ 2 ccm Eigengalle
abfließenden Galletropfen: 8, 6, 5, 6, 14, 10, 8, 9, 9, 8, 7, 14, 12, 11, 10, 9, 10, 10, 9, 7, 6, 7.

Versuch 15: Kaninchen, 2000 g. Injektion von Kaninchenlebergalle.

Zahl der in je 5 Minuten ↓ 2.5 ccm Galle ↓ 2,5 ccm Galle
abfließenden ccm Galle: 0,8, 0.9, 1,6, 0,7, 0,9, 0,9, 0,6, 0,7, 08, 1,6, 1,1, 0,9, 0,9, 0,8.

Versuch 16: Kaninchen, 2000 g. Injektion einer 5proz. Lösung von Natr. glykocholicum Kahlbaum.

Zahl der in je 5 Minuten ↓ 2 ccm 5proz. Natr. glykochol.
abfließenden ccm Galle: 0,7, 0,6, 0.65, 0.6, 1,2, 0,95, 0,75, 0,7, 0,55, 06.

Versuch 17: Weibliches Kaninchen, 2500 g. Injektion einer 2proz. Lösung von Natr. glykocholicum Merck.

Zahl der in je 5 Minuten ↓ 2,5 ccm 2proz. Natr. glykochol.
abfließenden ccm Galle: 0,8, 1,8, 1,4, 1,1, 1,0, 0,85, 0,85.

Versuch 18: Weibliches Kaninchen, 2500 g. Injektion einer 2proz. Lösung von synthet. Taurocholsäure[2]).

Zahl der in je 5 Minuten ↓ 2 ccm 2proz. Natr. taurochol.
abfließenden ccm Galle: 0,25, 0.30, 0.25, 0.70, 0.35, 0,3, 0.3, 0,3, 0.3, 0.25, 0.3.

---

[1]) Diese Zeitschr. **109**, 82. 1920.

[2]) Für Überlassung der synthet. Taurocholsäure bin ich Herrn Privatdozent *S. Bondi*, für Überlassung von Desoxycholsäure, Cholansäure und Cholatriensäure Herrn Prof. *Heinrich Wieland* zu Dank verpflichtet.

Versuch 19: Weibliches Kaninchen, 2150 g. Injektion einer 2proz. Lösung von Acid. cholalicum Merck.
Zahl der in je 5 Minuten ↓ 2 ccm 2 proz. Natr. cholalic. ↓ 2 ccm 2 proz. Natr. cholal.
abfließenden ccm Galle: 0,85, 1,5, 1,0, 0,85, 1,4, 1,0, 0,95, 0,75.

Versuch 20: Männliches Kaninchen, 2300 g. Injektion einer 1 proz. Lösung von Cholsäureäthylester in 40 proz. Alkohol. Der Ester wurde nach dem von *Bondi* und *Müller*[1]) abgeänderten Verfahren von *Hüfner* dargestellt. Schmelzpunkt 159°.
Zahl der in je 5 Minuten ↓ 2 ccm 1 proz. Cholsäureäthylester
abfließenden ccm Galle: 0,3, 0,4, 0,3, 0,5, 0,6, 0,5, 0,5, 0,3, 0,3, 0,4, 0,3.

Versuch 21: Männliches Kaninchen, 2000 g. Injektion von Jodcholsäure, dargestellt nach *Mylius*[2]), gelöst in Wasser unter Zusatz der zur Lösung erforderlichen Menge von Natrium carbonicum.
Zahl der in je 5 Minuten ↓ 1,5 ccm 2 proz. Jodcholsäure
abfließenden ccm Galle: 0,40, 0,30, 0,40, 0,65, 0,65, 0,50, 0,35, 0,40, 0,30, 0,25, 0,55, 0,45, 0,35, 0,25, 0,30, 0,25.
↑ 1 ccm 2 proz. Jodcholsäure

Versuch 22: Männliches Kaninchen, 1700 g. Injektion einer ½ proz. Lösung von Cholan(carbon)säure (Originalpräparat von *Wieland*).
Zahl der in je 5 Minuten ↓ 4 ccm ½ proz. cholan(carbon)saur. Natr.
abfließenden ccm Galle: 0,15, 0,15, 0,15, 0,10, 0,10, 0,15, 0,10, 0,15, 0,15, 0,15, 0,10, 0,15, 0,10, 0,15, 0,10, 0,10,
0,05, 0,10, 0,05, 0,20, 0,10, 0,10, 0,10, 0,10, 0,10, 0,05.
↑ 2 ccm ½ proz. Natr. cholalic.

Versuch 23: Weibliches Kaninchen, 2450 g. Injektion einer annähernd ½ proz. Lösung von Cholatrien(carbon)säure (Originalpräparat von *Wieland*).
Zahl der in je 5 Minuten ↓ 4 ccm ½ proz. cholatrien(carbon)saur. [Natr.
abfließenden ccm Galle: 1,2, 1,2, 1,1, 1,1, 1,0, 1,1, 1,0, 0,9, 0,7, 0,7, 0,7, 0,7.

Versuch 24: Weibliches Kaninchen, 2200 g. Injektion einer 2- und ½ proz. Lösung von Dehydrocholsäure, dargestellt nach *Hammarsten*[3]). Schmelzpunkt 230°.
Zahl der in je 5 Minuten ↓ 2 ccm 2 proz. dehydrochols. Natr.
abfließenden ccm Galle: 0,5, 0,5, 0,55, 0,5, 1,5, 1,3, 1,0, 0,7, 0,65, 0,6, 0,55, 0,95, 0,8, 0,65, 0,5.
↑ 1 ccm ½ proz. dehydrocholsaures Natr.

Versuch 25: Weibliches Kaninchen, 1700 g. Injektion einer 2 proz. Lösung von Biliansäure, dargestellt nach *Lassar-Cohn*[4]). Schmelzpunkt 269°.
Zahl der in je 5 Minuten ↓ 2 ccm 2 proz. biliansaures Natr.
abfließenden ccm Galle: 0,5, 0,5, 0,45, 0,4, 0,4, 0,45, 0,45, 0,5, 0,4, 0,45, 0,35, 0,35, 1,3, 0,7, 0,5, 0,4, 0,35.
↑ 2 ccm 2 proz. Natr. glykochol. Merck.

Versuch 26: Männliches Kaninchen, 2100 g. Injektion einer 2 proz. Lösung von Ciliansäure, dargestellt nach *Lassar-Cohn*[5]). Schmelzpunkt 232—242°.
Zahl der in je 5 Minuten ↓ 2 ccm 2 proz. ciliansaures Natr.
abfließenden ccm Galle: 0,45, 0,35, 0,30, 0,35, 0,30, 0,35.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **47**, 499. 1906.
[2]) B. **20** (2), 683.
[3]) B. **14**, 71. 1881.
[4]) B. **32**, 683. 1899.
[5]) B. **32**, 683. 1899.

Versuch 27: Männliches Kaninchen, 1600 g. Injektion einer 2proz. Lösung von Desoxycholsäure (Präparat von *Wieland*).

Zahl der in je 1 Minute ↓ 2 ccm 2 proz. desoxycholsaures Natr.
abfließenden Galletropfen: 21, 22, 42, 76, 118, 102, 54, 41, 33, 29, 27,
24, 23, 48, 40, 31, 25.
↑ 2 ccm 2 proz. Natr. cholalic.

Versuch 28: Weibliches Kaninchen, 2000 g. Injektion einer annähernd 2proz. Lösung von Choloidansäure, dargestellt nach *Pregl*[1]).

Zahl der in je 5 Minuten ↓ 2,5 ccm 2 proz. choloidansaures Natr.
abfließenden ccm Galle: 0,5, 0,5, 0,75, 0,5, 0,5, 0,35, 0,4, 0,4, 0,45,
↓ 3 ccm 2 proz. choloidansaures Natr.
0,5, 06, 0,5, 0,5, 0,45.

Galle, die Natriumsalze der Cholsäure und der Glyko- und Taurocholsäure, der Äthylester und die Myliussche Jodverbindung der Cholsäure und deren nächstes Oxydationsprodukt, die Dehydrocholsäure, erhöhen nach diesen Versuchsergebnissen die Gallenmenge. Auffallenderweise haben die von *H. Wieland* und *Weil*[2]) hergestellten Abbauprodukte der Cholsäure *die Cholan(carbon)säure* und *Cholatrien(carbon)säure,* ferner auch die Oxydationsprodukte, *die Biliansäure und Ciliansäure keine cholagoge Wirkung.* Weniger merkwürdig erscheint dies von der *Choloidansäure,* da in ihr 6 Kohlenstoffatome des Cholsäurekernes abgespalten sind, während in den anderen eben genannten unwirksamen Säuren der Cholsäurekern ganz oder fast unverändert geblieben ist und nur die Seitenketten Veränderungen erfahren haben. *Die stärkste galletreibende Wirkung kommt der Desoxycholsäure zu,* einer Säure, die *Pregl* als normalen Gallenbestandteil gefunden hat; sie ist nach *H. Wieland* und *Sorge*[3]) als Dioxycholan(carbon)säure, die Cholsäure als Trioxycholan(carbon)säure aufzufassen; beide Säuren stehen einander chemisch sehr nahe, geben bei trockener Destillation im Vakuum und folgender Hydrierung dieselbe Cholan(carbon)säure. Die Feststellung ist von Interesse, daß gerade die beiden Säuren, die als solche oder in Paarungs- bzw. Additionsverbindungen (Choleinsäuren) in der Galle vorkommen und außer ihnen nur die Dehydrocholsäure unter allen untersuchten Substanzen eine sichere cholagoge Wirkung haben; wenn die Leber so fein in ihrer gallensekretorischen Funktion abgestimmt ist, daß schon relativ geringfügige Veränderungen in der chemischen Konstitution dieser Säuren ihre cholagoge Wirkung aufheben, so ist es auch nicht verwunderlich, daß Versuche ein Cholagogum außerhalb der Gruppe der Gallensäuren zu finden, fehlschlugen. Die 3 wirksamen Gallensäuren sind gesättigte einbasische Säuren, von denen die Cholsäure

$$C_{20}H_{31}\begin{array}{l}CH_2OH\\CHOH\ CH_2OH\\COOH\end{array}$$

3, die Desoxycholsäure 2 Alkoholgruppen, die

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**, 160. 1910.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**, 285. 1912.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**, 59. 1916/17.

Dehydrocholsäure wahrscheinlich 3 Ketongruppen enthält. Die wirkungslose Biliansäure ist nach *Mylius* eine dreibasische Diketonsäure $C_{19}H_{31}(CO)_2(COOH)_3$, auch die Ciliansäure ist nach *Lassar-Cohn* dreibasisch. Für die cholagoge Wirkung erscheint aber nicht der Umstand ausschlaggebend, ob die Säure ein- oder mehrbasisch ist, denn die Substanz, die man durch trockene Destillation der Cholsäure im Vakuum erhält, die Cholatrien(carbon)säure, eine 3fach ungesättigte einbasische Säure, und ihr Hydrierungsprodukt, die gesättigte einbasische Cholan(carbon)säure

$$C_{20}H_{31}CH_2 \begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \\ COOH \end{matrix}$$

, die sich von der Cholsäure — wie *Heinrich Wieland* und *F. J. Weil* [1]), die ersten Darsteller dieser Säuren, zeigten — nur durch das Fehlen dreier Hydroxylgruppen unterscheidet, sind wirkungslos. Wenn man annehmen will, daß die Beschaffenheit der Seitenketten von wesentlicher Bedeutung dafür ist, ob ein Körper cholagog wirkt oder nicht, so wären *Cholagoga zunächst in der Gruppe der einbasischen Alkohol- und Ketonsäuren zu suchen.*

Es liegt von vornherein die Möglichkeit nahe, daß die physikalischen Eigenschaften der Gallensäuren, unter denen besonders ihre hohe Oberflächenaktivität auffällt, mit ihrer Wirkung als Cholagoga zusammenhängt; nun ergibt aber die Bestimmung der Oberflächenspannung auch für eine Lösung von nicht cholagogem, biliansaurem Natrium eine sehr bedeutende Herabsetzung der Oberflächenspannung, die zwar geringer ist als die der Natriumsalze der Cholsäure und Desoxycholsäure, aber wesentlich größer als die einer Lösung des stark galletreibenden dehydrocholsauren Natriums.

Versuch 29: Oberflächenspannungswerte bezogen auf Wasser = 1000.

Konzentration	Desoxycholsaures Natrium	Cholsaures Natrium	**Biliansaures Natrium**	**Dehydrocholsaures Natrium**
2%	650,6	672,4	708,7	801,0
1,5%	653,3	678,2	740,3	799,8
1,0%	662,8	678,6	780,0	851,0
0,5%	672,5	675,1	825,3	895,0
0,25%	676,6	726,1	882,4	942,0
0,1%	707,2	789,7	911,9	976,1
0,05%	722,8	813,4	961,4	987,3

Die galletreibende Wirkung der intravenös injizierten Galle und der gallensauren Salze tritt nach wenigen Sekunden auf. Die Kurve der Gallensekretionsgröße steigt steil an, erreicht nach cholsaurem Natrium und dessen Paarungsprodukten meist schon in der 1. bis 2. Minute, nach desoxycholsaurem Natrium durchschnittlich in der 2. Minute ihre größte Höhe, senkt sich langsamer als sie stieg. Die geringe Ver-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**. 295. 1912.

mehrung der Gallenmenge nach Choloidansäure setzt sofort ein, geht schnell vorüber, ist wohl eine Folge einer die Injektion begleitenden Kontraktion der Gallenwege.

In Fällen, in denen die Anwendung gallensekretionsbefördernder Mittel angezeigt erscheint, könnte eine besonders kräftige Wirkung durch Desoxycholsäure erzielt werden; freilich ist zu bedenken, daß sie, wie *Hermann Wieland*[1]) gezeigt hat, giftiger ist, eine stärkere Herzwirkung hat, stärker hämolysiert als die Cholsäure, daher wohl auch nur in entsprechend kleineren Gaben therapeutische Anwendung wird finden können; mit der stärkeren hämolytischen Wirkung steht offenbar die Tatsache in Zusammenhang, daß der Farbstoffgehalt der Galle nach intravenöser Injektion von desoxycholsaurem Natrium besonders stark zunimmt; die Farbe der Galle wird viel intensiver grün als nach Injektion der gleichen Menge von cholsaurem Natrium.

Die cholagogen Gallensäuren — untersucht wurden in dieser Hinsicht die *Cholsäure und Desoxycholsäure — erhöhen intravenös injiziert den Gallensekretionsdruck.* Bestimmt wurde in diesen Versuchen jener Druck, den *Bürker*[2]) den „pathologischen" Gallendruck nennt, wobei der Galle kein anderer Abfluß nach außen möglich ist als der in ein mit den Gallenwegen verbundenes Steigrohr; die Galle wird dann gegen den Druck der allmählich ansteigenden Gallensäule sezerniert. *Bürker*, der derartige Versuche an Kaninchen angestellt hat, sah dabei einen immer langsamer werdenden Anstieg der Gallensäule bis ein Maximum erreicht ist, der Druck sinkt dann, zeigt geringe periodische Schwankungen und fällt unter Schwankungen langsam ab. *Bürker* bezieht diese in etwa 5 Minuten ablaufenden Schwankungen auf periodische Veränderungen im Kontraktionszustand der Gallenwege. In eigenen Versuchen, die im übrigen *Bürkers* Befunde bestätigten, verschwanden die periodischen Schwankungen bei künstlicher Atmung des Tieres mit dem *Meyer*schen Respirationsapparat. Die Gallensäule steigt dann allmählich an, sinkt nach erreichtem Höhepunkt zeitweise rascher, zeitweise langsamer, ohne daß aber die von ihr beschriebene Steighöhenkurve andere Tal- und Bergbildungen aufweist als die durch die einzelnen Atemstöße bedingten. Wie diese kleinen hängen also offenbar auch die größeren periodischen Wellen der Gallendruckkurve mit Veränderungen im intrathorakalen Druck zusammen; auf die Bedeutung der Atmung für die Entleerung der Galle hatte schon *Boerhave* aufmerksam gemacht, *Hofbauer*[3]) neuerdings auf sie verwiesen. — Injiziert man einem Kaninchen in einem derartigen Versuch mit oder ohne künstliche Atmung 1,5—2 ccm einer 2proz. Lösung von cholsaurem oder desoxycholsaurem Natrium auf der Höhe oder im abfallenden Schenkel der Druckkurve, so steigt der Druck für die Dauer von 4—10 Minuten bis um 15—30 mm Galle.

[1]) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **86**, 79. 1920.
[2]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **83**, 241. 1901.
[3]) Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chirurg. **24**, 583. 1912.

Versuch 30: Männliches Kaninchen, 2300 g. Urethannarkose, Jugulariskanüle, Ductus cysticus abgeklemmt, Choledochusfistel mit kommunizierendem Steigrohr.

Zeit	Gallendruck in mm Galle	Zeit	Gallendruck in mm Galle	Zeit	Gallendruck in mm Galle	Bemerkungen
$3^h\,50'$	184	$4^h\,11'$	204	$4^h\,31'$	208	
$3^h\,51'$	186	$4^h\,12'$	204,4	$4^h\,32'$	208,2	
$3^h\,52'$	187,6	$4^h\,13'$	205	$4^h\,33'$	206,4	
$3^h\,53'$	188	$4^h\,14'$	205	$4^h\,34'$	207,6	
$3^h\,54'$	189,6	$4^h\,15'$	205	$4^h\,35'$	208,2	
$3^h\,55'$	190	$4^h\,16'$	206	$4^h\,36'$	210,2	
$3^h\,56'$	192	$4^h\,17'$	206,4	$4^h\,37'$	210,2	
$3^h\,57'$	192	$4^h\,18'$	207,4	$4^h\,38'$	212,2	
$3^h\,58'$	193	$4^h\,19'$	206,2	$4^h\,39'$	212,2	
$3^h\,59'$	194	$4^h\,20'$	206,2	$4^h\,40'$	211,6	Um $4^h\,40'$ werden
$4^h\,0'$	195,8	$4^h\,21'$	207,8	$4^h\,41'$	225,0	2 ccm 2 proz. chols.-
$4^h\,1'$	197,8	$4^h\,22'$	207,4	$4^h\,42'$	227,0	Natr.-Lösung in
$4^h\,2'$	198,6	$4^h\,23'$	213,4	$4^h\,43'$	217,0	der Jugularvene
$4^h\,3'$	199,4	$4^h\,24'$	209,6	$4^h\,44'$	211,8	injiziert.
$4^h\,4'$	200,2	$4^h\,25'$	209	$4^h\,45'$	206,2	
$4^h\,5'$	199,8	$4^h\,26'$	211,4	$4^h\,46'$	206,0	
$4^h\,6'$	199,8	$4^h\,27'$	208,0	$4^h\,47'$	206,0	
$4^h\,7'$	201,6	$4^h\,28'$	209,8	$4^h\,48'$	206,0	
$4^h\,8'$	201,8	$4^h\,29'$	208,6	$4^h\,49'$	206,0	
$4^h\,9'$	202,4	$4^h\,30'$	208	$4^h\,50'$	207,0	
$4^h\,10'$	202,4					

Versuch 31: Männliches Kaninchen, 2300 g. Urethannarkose, Jugulariskanüle. Gallenblasengang abgeklemmt, Choledochusfistel mit kommunizierendem Steigrohr. Künstliche Atmung.

Zeit	Gallendruck in mm Galle	Zeit	Gallendruck in mm Galle	Zeit	Gallendruck in mm Galle	Bemerkungen
$3^h\,21'$	165	$3^h\,41'$	200	$4^h\,1'$	189	
$3^h\,22'$	169	$3^h\,42'$	200	$4^h\,2'$	188	
$3^h\,23'$	174	$3^h\,43'$	199	$4^h\,3'$	185,4	
$3^h\,24'$	178	$3^h\,44'$	198	$4^h\,4'$	183	
$3^h\,25'$	181	$3^h\,45'$	197,4	$4^h\,5'$	179	
$3^h\,26'$	184	$3^h\,46'$	197,4	$4^h\,6'$	177	
$3^h\,27'$	187	$3^h\,47'$	197,4	$4^h\,7'$	174,4	
$3^h\,28'$	190	$3^h\,48'$	197,2	$4^h\,8'$	174	
$3^h\,29'$	194	$3^h\,49'$	197	$4^h\,9'$	174	
$3^h\,30'$	197	$3^h\,50'$	196	$4^h\,10'$	174	Um $4^h\,10'$ werden
$3^h\,31'$	200	$3^h\,51'$	195	$4^h\,11'$	199	1,5 ccm einer
$3^h\,32'$	209	$3^h\,52'$	195	$4^h\,12'$	202	2 proz. Lösung von
$3^h\,33'$	212	$3^h\,53'$	194	$4^h\,13'$	189	desoxycholsaurem
$3^h\,34'$	211,4	$3^h\,54'$	193	$4^h\,14'$	182	Natrium in die Ju-
$3^h\,35'$	210	$3^h\,55'$	193	$4^h\,15'$	181	gularvene injiziert
$3^h\,36'$	208	$3^h\,56'$	192	$4^h\,16'$	181	
$3^h\,37'$	205	$3^h\,57'$	192	$4^h\,17'$	181	
$3^h\,38'$	204	$3^h\,58'$	192	$4^h\,18'$	179,4	
$3^h\,39'$	203	$3^h\,59'$	192	$4^h\,19'$	177,4	
$3^h\,40'$	202	$4^h\,0'$	192	$4^h\,20'$	169	

II.

Nach Feststellung der galletreibenden Körper der Gallensäuregruppe war weiter zu untersuchen, ob und in welcher Weise die Beschaffenheit


Ausschnitt aus der Gallendruckkurve von Versuch 30[1]).

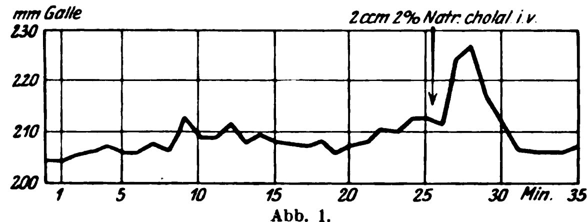


Abb. 1.

der unter ihrem Einfluß gebildeten Galle sich von der Normalgalle unterscheidet. Derartige Untersuchungen können auch als Grundlagen für weitere Studien in praktischer Richtung von Wert sein. Wenn derzeit auch die Wirkung eigentlich cholagoger Mittel auf gewisse Erkrankungen der Gallenwege, auf Konkrementbildungen in der Galle zumeist geleugnet wird, so erscheint dieser ablehnende Standpunkt von vornherein wenigstens nicht gerechtfertigt. Es liegt sehr wohl im Bereich der Möglichkeit, ja Wahrscheinlichkeit, daß Veränderungen in der Beschaffenheit der Galle, in ihrer physikalischen Eigenart, in ihrer Lösungsfähigkeit für verschiedene Substanzen, wie sie sehr gut durch gallensekretionsbefördernde Mittel herbeigeführt werden können, einen Einfluß auf Bildung und Zerstörung von Gallensteinen ausüben, selbst wenn man ohne unbedingte Berechtigung von dem gröber mechanischen Durchspülen der Gallenwege keinerlei Wirkung annehmen möchte. Hinsichtlich der Veränderungen der Galle unter dem Einfluß gallensaurer Salze schließt *Socoloff*[2]) aus seinen Versuchen auf eine wassertreibende Wirkung dieser Substanzen in der Leber; er fand nach intravenöser Injektion von glykocholsaurem Natrium den Prozentgehalt der Galle an gallensauren Salzen vermindert, den absoluten Trockenrückstand der Galle wenigstens nicht regelmäßig erhöht. Früher hatte *Huppert*[2]) in 2 Versuchen eine absolute Zunahme der Gallensäureausscheidung und *Schiff*[2]) eine Konzentrationszunahme der Galle nach intravenöser Injektion einer Lösung von gallensaurem Natrium gesehen. Von einschlägigen Untersuchungen jüngerer Autoren sei noch die von *Winogradow*[2]) erwähnt, der nach Zufuhr von Trockengalle keine Veränderung im relativen Trockenrückstand und im Prozentgehalt der alkohollöslichen Bestandteile der in vermehrter Menge ausgeschiedenen Galle fand, also eine absolute Mehrausscheidung beider; nach Zufuhr eines aus Eiweiß, tauro- und glykocholsaurem Natrium bestehenden Präparats stellte er einen unveränderten Prozentgehalt an festen Bestandteilen und einen erhöhten absoluten und relativen Gehalt an alkohollöslichen Körpern fest. Schließlich beobachteten *Pfaff* und *Balch*[2])

[1]) Die den einzelnen Atemzügen entsprechenden Wellen sind weder aus dieser Kurve noch aus nebenstehenden Tabellen ersichtlich.

[2]) a. a. O.

bei einem Menschen mit totaler Gallenfistel nach Zufuhr von Eigengalle. Ochsengalle und einem Gemenge von glyko- und taurocholsaurem Natrium eine Zunahme der Gallensäurekonzentration in der Galle.

Mit einer in einer früheren Mitteilung beschriebenen und begründeten Methodik[1]) wurden nun neuerdings Gallenproben untersucht, die unter dem Einfluß sicher cholagoger gallensaurer Salze in vermehrter Menge gebildet worden waren. Im folgenden wird stets nur ein charakteristischer Versuch jeder Versuchsreihe tabellarisch und meist gekürzt angeführt.

Versuch 32: Weibliches Kaninchen, 2500 g.

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberflächenspannung	Spezif. Gew.	Trockenrückstand in %	Trockenrückstand in g	Trockenrückstand in g für 15 Min. berechnet	Viscosität	Bemerkungen
$2^h 45'-3^h$	3,7							
$3^h\ \ -3^h 15'$	3,0							
$3^h 15'-3^h 30'$	2,7							
$3^h 30'-3^h 45'$	2,7							
$3^h 45'-4^h$	2,9							
$4^h\ \ -4^h 15'$	2,6							
$4^h 15'-4^h 30'$	2,7							
$2^h 45'-4^h 30'$	20,3	624,3	1010,5	1,76	0,3573	0,0514	103,3	Um $4^h 25'$, $4^h 50'$ und 5[illegible] werden je 2,5 ccm Eigengalle in die Jugularvene injiziert[2]).
$4^h 30'-4^h 45'$	3,2							
$4^h 45'-5^h$	3,1							
$5^h\ \ -5^h 15'$	3,0							
$5^h 15'-5^h 30'$	2,4							
$4^h 30'-5^h 30'$	11,7	624,3	1010,5	1,76	0,2059	0,0515	102,8	
$5^h 30'-5^h 45'$	2,6							
$5^h 45'-6^h$	2,5							
$6^h\ \ -6^h 15'$	2,1							
$6^h 15'-6^h 30'$	2,4							
$6^h 30'-6^h 45'$	2,2							
$5^h 30'-6^h 45'$	11,8	627,2	1009,5	1,69	0,1994	0,0399	102,4	Um $6^h 40'$ und 7^h werden je 2,5 ccm einer 2proz. Lösung von Natr. glykochol. *Merck* in die Jugularvene injiziert.
$6^h 45'-7^h$	3,6							
$7^h\ \ -7^h 15'$	4,3							
$7^h 15'-7^h 30'$	2,7							
$6^h 45'-7^h 30'$	10,6	**641,9**	**1010,7**	**2,02**	**0,2141**	**0,0714**	106,1	
$7^h 30'-7^h 45'$	2,6							
$7^h 45'-8^h$	2,4							
$8^h\ \ -8^h 15'$	2,4							
$8^h 15'-8^h 30'$	2,1							
$8^h 30'-8^h 45'$	2,3							
$7^h 30'-8^h 45'$	11,8	628,8	1009,4	1,65	0,1947	0,0389	103,3	

[1]) a. a. O.

[2]) Die Wirkung der ersten Injektion fällt zeitlich noch in die erste Auffangperiode, in der sich auch noch der Beginn ihrer gallensekretionssteigernden Wirkung äußern konnte; die unter dem Einfluß der Injektion gebildete Galle kommt aber wegen der Länge der etwa 1,5 ccm fassenden Leitung von der Leber bis zum Abtropfende naturgemäß erst in der folgenden Periode zum Ausdruck, was auch in den weiteren Versuchen gilt.

Versuch 33: Weibliches Kaninchen, 2000 g.

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberflächenspannung	Spez. Gewicht	Trockenrückstand in %	Trockenrückstand in g	Trockenrückstand in g für 15 Min. berechnet	Viscosität	Bemerkungen
^{h} 30′—4^h 45′	1,55							
^{h} 45′—5^h	1,45							
^{h} —5^h 15′	1,65							
^{h} 30′—5^h 15′	4,65	633,1	1009,1	1,63	0,0758	0,0253	101,5	
^{h} 15′—5^h 30′	1,3							
^{h} 30′—5^h 45′	1,4							
^{h} 45′—6^h	1,1							
^{h} —6^h 15′	1,6							
^{h} 15′—6^h 15′	5,4	632,0	1009,1	1,60	0,0864	0,0216	101,3	
^{h} 15′—6^h 30′	1,1							
^{h} 30′—6^h 45′	1,4							
^{h} 45′—7^h	1,4							
^{h} —7^h 15′	1,6							
^{h} 15′—7^h 30′	1,4							
^{h} 30′—7^h 45′	2,4							
^{h} 15′—7^h 45′	9,3	633,0	1008,8	1,59	0,1479	0,0246	103,0	Um 7^h 35′ und 8^h 5′ werden 2,5 bzw. 2,0 ccm einer 2proz. Lösung von Acid. cholalic *Merck* als Natriumsalz in die Jugularvene injiziert.
7^h 45′—8^h	1,5							
8^h —8^h 15′	2,3							
8^h 15′—8^h 30′	1,45							
7^h 45′—8^h 30′	5,25	**661,5**	**1010,8**	**2,32**	0,1218	**0,0406**	**105,7**	
8^h 30′—9^h 30′	5,2	648,9	1009,4	1,88	0,1034	0,0258	103,0	

Versuch 34: Weibliches Kaninchen, 1700 g.

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberflächenspannung	Spez. Gewicht	Trockenrückstand in %	Trockenrückstand in g	Trockenrückstand in g für 15 Min. berechnet	Bemerkungen
1^h —2^h	6,6	623,4	1010,7				
2^h —2^h 15′	1,40						
2^h 15′—2^h 30′	1,25						Um 2^h 30′ werden 2 ccm einer 2proz. Lösung von biliansaurem Natrium in die Jugularvene injiziert.
2^h 30′—2^h 45′	1,40						
2^h —2^h 45′	4,05	623,0	1010,7				
2^h 45′—3^h	1,25						
3^h —3^h 15′	2,0						Um 3^h 10′ werden 2 ccm einer 2proz. Lösung von Natr. glycochol. *Merck* in die Jugularvene injiz.
2^h 45′—3^h 15′	3,25	625,9	1010,4				
2^h 15′—3^h 45′	2,6	**637,1**	**1011,0**				
3^h 45′—4^h	1,0						
4^h —4^h 15′	2,0						Um 4^h 5′ werden 2 ccm einer 2proz. Lösung von Natr. glycochol. *Merck*, die mit Cholesterin heiß gesättigt worden war, in die Jugularvene injiziert.
3^h 45′—4^h 15′	3,0	634,6	1011,0				
4^h 15′—4^h 30′	1,2						
4^h 30′—4^h 45′	0,95						
4^h 45′—5^h	0,9						
4^h 15′—5^h	3,05	**642,8**	**1012,6**	**2,58**	0,0787	**0,0262**	

Versuch 34 (Fortsetzung).

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberflächenspannung	Spez. Gewicht	Trockenrückstand in %	in g	in g für 15 Min. berechnet	Bemerkungen
5^h – $5^h\,15'$	0,85						
$5^h\,15'$–$5^h\,30'$	0,9						
$5^h\,30'$–$5^h\,45'$	1,3						
5^h –$5^h\,45'$	3,05	636,1	1011,6	1,87	0,0569	0,0189	Um 5^h 35 werden 2 ccm einer 2 proz. Lösung von Natrium taurocholat in die Jugularvene injiziert.
$5^h\,45'$–6^h	0,9						
6^h –$6^h\,15'$	0,85						
$5^h\,45'$–$6^h\,15'$	1,75	**644,4**	**1012,7**	**2,48**	0,0434	**0,0217**	

Versuch 35: Weibliches Kaninchen, 2200 g.

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberflächenspannung	Spez. Gewicht	Trockensubstanz in %	in g	in g für 15 Min. berechnet	Viscosität	Bemerkungen
3^h – $3^h\,15'$	3,4							
$3^h\,15'$–$3^h\,30'$	3,3							
$3^h\,30'$–$3^h\,45'$	3,1							
$3^h\,45'$–4^h	2,7							
4^h –$4^h\,15'$	3,5							
3^h –$4^h\,15'$	16,0	621,7	1009,5	1,65	0,2640	0,0528	101,4	Um $4^h\,10'$ werden 1,5 ccm einer 2 proz. Lösung von desoxycholsaurem Natrium in die Jugularvene injiziert.
$4^h\,15'$–$4^h\,30'$	3,6							
$4^h\,30'$–$4^h\,45'$	2,6							
$4^h\,15'$–$4^h\,45'$	6,2	**625,9**	**1009,4**	**1,62**	0,1004	**0,0502**	**103,5**	
$4^h\,45'$–5^h	2,2							
5^h – $5^h\,15'$	1,9							
$5^h\,15'$–$5^h\,30'$	2,0							
$5^h\,30'$–$5^h\,45'$	1,8							
$5^h\,45'$–6^h	1,8							
6^h –$6^h\,15'$	1,7							
$4^h\,45'$–$6^h\,15'$	11,4	626,3	1009,3	1,35	0,1539	0,0256	100,8	
$6^h\,15'$–$6^h\,30'$	1,7							
$6^h\,30'$–$6^h\,45'$	1,6							
$6^h,45$–7^h	1,4							
7^h –$7^h\,15'$	1,75							
$6^h\,15'$–$7^h\,15'$	6,45	634,1	1008,6	1,47	0,0948	0,0237	104,7	Um $7^h\,10'$ werden 1,3 ccm einer 2 proz. Lösung von cholsaurem Natrium in die Jugularvene injiziert.
$7^h\,15'$–$7^h\,30'$	1,70							
$7^h\,30'$–$7^h\,45'$	1,40							
$7^h\,45'$–8^h	1,35							
8^h –$8^h\,15'$	1,40							
$7^h\,15'$–$8^h\,15'$	5,85	**658,6**	**1008,8**	**1,59**	0,0930	**0,0232**	**102,2**	

Aus diesen und weiteren Versuchen geht hervor, daß *Injektion von Eigengalle Oberflächenspannung, spezifisches Gewicht und prozentischen Trockenrückstand unbeeinflußt läßt, daß nach Injektion von cholsaurem, glyko- und taurocholsaurem Natrium die Oberflächenspannung der Galle*

steigt, sich der des Wassers nähert, *daß spezifisches Gewicht und absoluter und relativer Trockenrückstand wachsen. Desoxycholsäure läßt Oberflächenspannung, spezifisches Gewicht und relativen Trockenrückstand entweder fast unbeeinflußt oder erhöht spezifisches Gewicht und Trockenrückstand, während gleichzeitig die Oberflächenspannung sinkt.* Versuche über die Wirkung nichtcholagoger Gallensäureabkömmlinge sollen hier nicht ausführlich dargestellt werden: Diese Körper lassen auch die untersuchten Eigenschaften der Galle unverändert. Die Gallenviscosität ist unter dem Einfluß cholagoger Gallensäuren in der Regel erhöht.

Die Befunde über die Veränderung der Galle durch Desoxycholsäure, vor allem aber die durch Cholsäure und deren Paarungsprodukte — von der Besprechung der Wirkung der Galle, die infolge ihrer geringeren Gallensäurekonzentration ein minder kräftiges Cholagogum ist, soll abgesehen werden — sind nun recht auffallend, stehen geradezu in einem inneren Widerspruche. Wenn die Gallensäuren spezifisches Gewicht und Trockenrückstand der Galle erhöhen, so liegt es nahe, anzunehmen, daß sie eben mit der Galle in vermehrter Menge ausgeschieden werden. Mit Rücksicht darauf, daß mit der Zunahme der Gallensäurekonzentration die Oberflächenspannung der Galle abnimmt, mit ihrer Abnahme steigt[1]), wäre unbedingt zu erwarten, daß die Oberflächenspannung der Galle unter dem Einfluß dieser Cholagoga sinkt; dies geschieht auch in einzelnen Fällen und meist in geringem Ausmaße nach Desoxycholsäurezufuhr, in der Regel unterscheidet sich aber die Oberflächenspannung verschiedener Gallenportionen eines Desoxycholsäureversuchs nicht von der eines Normalversuches; besonders überraschend ist es aber, daß die Cholsäure und deren Paarungsprodukte geradezu das Gegenteil von dem zu Erwartenden hervorbringen, einen Anstieg der Oberflächenspannung, eine Annäherung an den Oberflächenspannungswert des Wassers. Das gibt doch zu denken, ob denn die Zunahme des Trockenrückstandes und des spezifischen Gewichtes in der Tat durch eine Zunahme der Gallensäurekonzentration zustande kommt und verlangt als Kontrolle eine quantitative Bestimmung des Gallensäuregehalts auf chemischem Wege trotz der Mängel dieser Methode.

In den unten angeführten Beispielen dieser Versuchsreihe wurde die Gallensäuremenge in der Art bestimmt, daß die Galle zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit absolutem, siedendem Alkohol wiederholt extrahiert wurde; das Ungelöste wurde abzentrifugiert, die alkoholische Lösung mit Äther gefällt. die abzentrifugierte Fällung neuerdings mit absolutem Alkohol gelöst, der Trockenrückstand dieser alkoholischen Lösung gewogen.

In dieser Versuchsreihe wurde aus einem unten erörterten Grunde auch die Gefrierpunktserniedrigung der einzelnen Gallenportionen mit dem *Beckmann*schen Apparat bestimmt.

[1]) Siehe *Ernst Neubauer*, diese Zeitschr. **109**, 82 (89, 90). 1920.

Versuch 36: **Männliches Kaninchen, 2000 g.**

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberfläch.-spannung	Spezifisches Gewicht	Trockenrückstand in %	Trockenrückstand in g	Trockenrückstand in g für 15 Min. berech.	Gallensäuren in %	Gallensäuren in g	Gallensäuren in g für 15 Min. berech.	Δ	Bemerkungen
2h 45′—3h	2,5										
3h —3h 15′	2,4										
3h 15′—3h 30′	2,4										
3h 30′—3h 45′	2,5										
3h 45′—4h	2,5										
4h —4h 15′	3,3										
3h 45′—4h 15′	15,6	625,7	1009,9	1,91	0,2980	0,0497	0,86	0,1342	0,0223	− 0,65	Um 4h 10′ und 4h 50′ werden je 2,5 ccm Eigengalle in die Jugularvene injiziert.
4h 15′—4h 30′	2,6										
4h 30′—4h 45′	2,2										
4h 45′—5h	3,5										
5h —5h 15′	2,6										
4h 15′—5h 15′	10,9	**625,0**	**1010,0**	**1,83**	0,1995	**0,0499**	**0,91**	0,0992	**0,0248**	− 0,72	
5h 15′—5h 30′	2,4										
5h 30′—5h 45′	2,4										
5h 45′—6h	2,1										
6h —6h 15′	2,3										
6h 15′—6h 30′	2,0										
6h 30′—6h 45′	1,9										
6h 45′—7h	1,8										
7h —7h 15′	1,8										
7h 15′—7h 30′	1,7										
7h 30′—7h 45′	2,5										
5h 15′—7h 45′	20,9	627,5	1009,1	1,57	0,3281	0,0328	0,50	0,1045	0,0104	− 0,68	Um 7h 40′, 8h 15′, 8h 45′, 9h und 9h 30′ werden je 2,5 ccm einer 2 proz. Lösung von Natr. glycochol. *Merck* in die Jugularvene injiziert.
7h 45′—8h	1,9										
8h —8h 15′	1,3										
8h 15′—8h 30′	2,7										
8h 30′—8h 45′	1,6										
8h 45′—9h	2,3										
9h —9h 15′	2,6										
9h 15′—9h 30′	3,4										
9h 30′—9h 45′	3,0										
7h 45′—9h 45′	18,8	**650,7**	**1011,4**	**2,38**	0,4474	**0,0593**	**1,22**	0,2074	**0,0259**	− 0,78	

Versuch 37: **Männliches Kaninchen, 2300 g.**

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberfläch.-Spannung	Spezifisches Gewicht	Trockenrückstand in %	Trockenrückstand in g	Trockenrückstand in g für 15 Min. berech.	Gallensäuren in %	Gallensäuren in g	Gallensäuren in g für 15 Min. berech.	Δ	Bemerkungen
2h 45′—3h	3,2										
3h —3h 15′	2,3										
3h 15′—3h 30′	2,3										
3h 30′—3h 45′	2,2										
3h 45′—4h	3,1										
2h 45′—4h	13,1	634,6	1012,0	2,10	0,2751	0,0550	0,6575	0,0861	0,0174	− 0,73	Um 3h 50′ und 4h 25′ werden je 2 ccm einer 2 proz. Lösung von Natrium cholalicum in die Jugularvene injiziert.
4h —4h 15′	2,2										
4h 15′—4h 30′	2,9										
4h 30′—4h 45′	2,6										
4h 45′—5h	2,3										
5h —5h 15′	2,3										
4h —5h 15′	12,3	**648,4**	**1011,6**	**2,48**	0,3050	**0,0610**	**1,0750**	0,1322	**0,0264**	− 0,71	

Versuch 37 (Fortsetzung).

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberfläch.-Spannung	Spezifisches Gewicht	Trockenrückstand in %	Trockenrückstand in g	Trockenrückstand in g für 15 Min. berech.	Gallensäuren in %	Gallensäuren in g	Gallensäuren in g für 15 Min. berech.	Δ	Bemerkungen
5^h 15′—5^h 30′	2,4										
5^h 30′—5^h 45′	2,4										
5^h 45′—6^h	2,6										
6^h —6^h 15′	2,4										
6^h 15′—6^h 30′	2,4										
6^h 30′—6^h 45′	3,4										Um 6^h 40′ werden 2 ccm einer 2 proz. Lösung von desoxycholsaurem Natrium in die Jugularvene injiziert.
5^h 15′—6^h 45′	15,6	633,5	1010,4	1,83	0,1982	0,0322	0,5875	0,0906	0,0151	−0,68	
6^h 45′—7^h	4,8										
7^h —7^h 15′	2,55										
7^h 15′—7^h 30′	5,85										
7^h 30′—7^h 45′	2,9										
7^h 45′—8^h	2,5										
6^h 45′—8^h	18,6	**629,5**	**1010,8**	**2,10**	0,3906	**0,0781**	**0,7875**	0,1465	**0,0293**	−0,69	
8^h —8^h 15′	2,6										
8^h 15′—8^h 30′	2,1										
8^h 30′—8^h 45′	2,1										
8^h 45′—9^h	2,1										
9^h —9^h 15′	2,0										
9^h 15′—9^h 30′	2,0										
8^h —9^h 30′	12,9	637,8	1010,0	1,71	0,2206	0,0367	0,5275	0,0680	0,0113	−0,83	

Die auf Grund der gefundenen Erhöhung des spezifischen Gewichtes und des Trockenrückstandes als wahrscheinlich angenommene Erhöhung der Gallensäurekonzentration in der Galle nach Gallensäurezufuhr wird also durch das Ergebnis der chemischen Untersuchung sichergestellt. Zunahme des Gallensäuregehalts muß also nicht unbedingt — wie zu erwarten wäre — mit einer Abnahme der Oberflächenspannung der Galle einhergehen; Veränderungen der Oberflächenspannung der Galle gestatten demnach *keinen zwingenden* Schluß auf den Gallensäuregehalt; für gewöhnlich gilt aber die verkehrte Beziehung zwischen beiden Größen, Abweichungen von diesem Verhalten stellen einen auffälligen Befund dar.

Für die *Art des Zustandekommens der Erhöhung der Oberflächenspannung der Galle* unter dem Einfluß von cholsaurem, glyko- und taurocholsaurem Natrium trotz gleichzeitigem Anstiegs ihres Gallensäuregehaltes liegen verschiedene Möglichkeiten vor. Die Oberflächenspannung einer Lösung von Natriumglykocholat wird durch Zusatz von Kochsalz innerhalb gewisser Konzentrationen herabgesetzt [*Girard*[1]), *Bayer*[2]), *Lyon-Caen*[3])]; der oben dargestellte Befund könnte demnach durch eine *Abnahme der Kochsalzkonzentration* der Galle bedingt sein. Dagegen spricht aber der Umstand, daß die Differenz zwischen dem Prozentgehalt der Gallenportionen an Gesamttrockenrückstand und

[1]) Zit. nach *Berczeller*, diese Zeitschr. **66**, 173. 1914.
[2]) Diese Zeitschr. **13**, 234.
[3]) Thèse Paris 1910.

an Gallensäuren vor und nach der Injektion der cholagogen Gallensäure fast identisch ist, daß ferner die Gefrierpunktserniedrigung in den verschiedenen Gallenportionen fast gleich ist, eher nach Zufuhr von Gallensäuren etwas erhöht, was bei dem großen Molekül der Gallensäuren um so mehr von Bedeutung ist, und daß schließlich Erhöhung der Kochsalzkonzentration der Galle um $3^0/_{00}$ durch Zusatz von Kochsalz zur Galle nur eine geringe Herabsetzung ihrer Oberflächenspannung herbeiführt (z. B. von 649,3 auf 644,3). — Da nach *Berczeller*[1]) Zusatz von Säure die Oberflächenspannung einer Gallensäurelösung herabsetzt, könnte die paradoxe Erscheinung der Erhöhung der Oberflächenspannung in den beobachteten Fällen auf einer *Abnahme der H-Ionenkonzentration* beruhen; doch ließen Versuche, in denen die Reaktion der Galle wenigstens ebenso stark um den Umschlagspunkt von Phenolphthalein schwankte als in den Gallensäureversuchen, keine Veränderung der Oberflächenspannung wahrnehmen. — Schließlich liegt die Möglichkeit vor, daß *die Gallensäuren* mit gewissen Substanzen kolloidaler Natur *Komplexe bilden* oder nach dem von *H. Wieland* und *H. Sorge*[2]) aufgedeckten Choleinsäureprinzip *Additivverbindungen eingehen*, deren Oberflächenspannung eine andere ist als die der gallensauren Salze an sich; gegen die Bildung von Additivverbindungen als erklärendes Moment der beobachteten Erscheinung spricht eigentlich der Umstand, daß die Desoxycholsäure, die in besonders hohem Maße die Fähigkeit besitzt, derartige Verbindungen zu bilden, in weit geringerem Maße von dem zu fordernden Verhalten hinsichtlich der Oberflächenspannung der Galle Abweichungen bedingt als die anderen in Betracht kommenden Gallensäuren. Nach Beobachtungen von *Quagliariello*[3]) vermindert Casein die Oberflächenspannung einer Lösung von Natriumglykocholat. Es wäre denkbar, daß es unter dem Einfluß der Gallensäuren wie bei gewissen Vergiftungen [*Brauer*[4]), *Pilzecker*[5]), *Lang*[6])] zu Albuminocholie käme und daß das ausgeschiedene Eiweiß mit den Gallensäuren Kolloidkomplexe bilde und derart die Oberflächenspannung der Galle erhöht. Nun geben zwar diese Gallenportionen gelegentlich minimale Eiweißreaktionen, aber nicht regelmäßig, andererseits zeigten Gallen, die unabhängig von Gallensäurezufuhr Eiweißspuren enthielten, normale Oberflächenspannungswerte. Auch das Cholesterin, das leicht Kolloidkomplexe bildet, kommt als Partner in Betracht. Daß die Oberflächenspannung einer Lösung gallensaurer Salze durch Cholesterin erhöht

---

1) Diese Zeitschr. **84**. 59. 1917.
2) Zeitschr. f. physiol. Chem. **97**, 1. 1916.
3) Diese Zeitschr. **25**, 220.
4) Zeitschr. f. physiol. Chem. **40**, 182. 1903.
5) Zeitschr. f. physiol. Chem. **41**, 157. 1904.
6) Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **3**, 473. 1906.

werden kann, lehrt ein Versuch, in dem eine 2 proz. Lösung von Natriumglykocholat mit Cholesterin gesättigt wurde: Die Oberflächenspannung stieg von 637,7 auf 647 bei einem Cholesteringehalt von nicht ganz 1‰. Cholesterinbestimmungen in Kaninchengallen nach *Autenrieth* und *Funk* ergaben *vor* und *nach* Injektion gallensaurer Salze einen minimalen, quantitativ in den kleinen Gallenmengen nicht bestimmbaren Cholesteringehalt. — Erwähnt sei schließlich noch, daß Kochen der auf 2% Salzsäuregehalt gebrachten Galleportionen mit folgender Neutralisierung die paradoxe Differenz oft wesentlich verringerte; doch ist in diesen Versuchen die Abnahme der Oberflächenspannung infolge der entstehenden hohen Salzkonzentration so bedeutend, daß sonstige Differenzen in den Hintergrund gedrängt werden können.

Bei alledem erscheint doch die Auffassung, daß die paradoxe Oberflächenspannungserhöhung durch Anlagerung irgendeines möglicherweise nur in Spuren auftretenden Körpers oder einer gegenüber der Norm in größerer Menge vorhandenen Substanz an die Gallensäuren bedingt ist, als die wahrscheinlichste; *Lichtwitz*[1]) hält es für wahrscheinlich, daß bei der Bereitung der Galle und bei ihrer Sekretion Zellbestandteile vor allem das Cholesterin mitwirken und mit in das Sekret gehen, und für wohl denkbar, daß unter der Wirkung von Giften oder bei Bildung einer farbstoffreichen Galle dieser Vorgang in erhöhtem Ausmaß auftritt. In der paradoxen Erhöhung der Oberflächenspannung selbst könnte der Ausdruck eines Entgiftungsvorgangs der wegen ihrer starken

Versuch 38: Männliches Kaninchen, 2250 g, erhält nur am 21. II. 1921 um 7^h 45′ morgens 0,006 g Phosphor, am 22. II. um 9^h 0,01 g Phosphor in Öl gelöst subcutan. Um 3^h nachmittags Durchfall, Leber deutlich vergrößert tastbar, 4^h 45′ bis 5^h 10′ wird in Urethannarkose der Ductus cysticus abgeklemmt und eine Choledochusfistel angelegt.

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberfläch.-Spannung	Spezifisches Gewicht	Trockenrückstand			Gallensäure			Δ	Viscosität	Bemerkungen
				in %	in g	in g für 15 Min. berech.	in %	in g	in g für 15 Min. berech.			
5^h 15′—5^h 30′	2,4											
5^h 30′—5^h 45′	1,5											
5^h 45′—6^h	1,8											
6^h —6^h 15′	1,2											
5^h 15′—6^h 15′	6,4	627,7	1010,5	1,99	0,1274	0,0318	0,405	0,0259	0,0065		103,6	Um 6^h 15′, 6^h 45′ und 7^h werden je 2,5 ccm einer 2 proz. Lösung von Natrium cholalicum in die Jugularvene injiziert.
6^h 15′—6^h 30′	2,2											
6^h 30′—6^h 45′	1,6											
6^h 45′—7^h	2,0											
7^h —7^h 15′	2,2											
7^h 15′—7^h 30′	1,45											
6^h 15′—7^h 30′	9,45	**656,1**	**1011,5**	**2,41**	0,2277	**0,0455**	**0,649**	0,0618	**0,0123**	-71	106,9	
7^h 30′—7^h 45′	0,8	649,6	1011,7	2,85	0,0188	0,0188						7^h 58′ Exitus. Leber höchstgradig verfettet.

[1]) Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **13**, 1. 1914.

Oberflächenaktivität giftigen Gallensäuren gesehen werden; der Organismus duldet nicht, daß in ihm, im vorliegenden Fall in der Leber, die Oberflächenspannung unter ein Minimum fällt und überkompensiert sogar. Wenn dabei wirklich eine Abwehrmaßregel des Organismus vorliegt, so wäre es möglich, daß eine schwer geschädigte Leber diese Schutzfunktion nicht mehr aufbringt. Zur Prüfung dieser Frage wurde untersucht, wie die Galle eines mit Phosphor schwer vergifteten Tieres auf Zufuhr gallensaurer Salze antwortet. Es ergab sich ein Verhalten wie beim Normaltier.

Auch im Desoxycholsäureversuch verhielt sich das Phosphortier wie das Normaltier.

Die Galle mit schnell wirkenden Phosphordosen vergifteter Kaninchen ist kurz vor dem zu erwartenden Vergiftungstode arm an Gallensäuren und an Gallenfarbstoff; sie ist klar und heller gefärbt als Normalgalle, ihre Menge ist nicht verändert. Beim Hunde mit akuter Phosphorvergiftung sah *Stadelmann*[1]) gleichfalls Abnahme der Gallensäureausscheidung, gleichzeitig absolute Abnahme und relative Zunahme der Gallenfarbstoffausscheidung in der in verminderter Menge gelieferten Galle; er führt diese Veränderungen der Galle im wesentlichen auf eine verminderte Ausscheidungsmöglichkeit bei vielleicht auch herabgesetzter Bildung der Gallenbestandteile zurück. Beim phosphorvergifteten Kaninchen liegt die Sachlage insofern anders als auf Zufuhr von Gallensäuren sogleich ein Anstieg der Gallensäurekonzentration und nach Injektion einer sodaalkalischen Bilirubinlösung sofort eine starke Zunahme des Gallenfarbstoffgehaltes der Galle in Erscheinung tritt; die vorher schwach hellgrün gefärbte Galle wird tiefgelb. Diese Beobachtungen sprechen doch dafür, daß bei der Phosphorvergiftung primär die *Bildung* der Gallensäuren und des Gallenfarbstoffes gestört ist; daneben ist eine gewisse Erhöhung des Ausscheidungsschwellenwertes nicht ausgeschlossen, reichliche Zufuhr wird aber trotz schwerster Leberverfettung mit vermehrter Ausscheidung beantwortet.

III.

Die beschriebene Wirkung der Gallensäuren tritt auch ein, wenn man einen *anderen Weg der Zufuhr* wählt, z. B. bei Injektion in eine *Mesenterialvene*, andererseits auch, wenn man nach Unterbindung der Pfortader in die Jugularvene injiziert, in letzterem Fall oft mit einer kleinen Verzögerung.

Versuch 39: Kaninchen, 2000 g. Injektion einer 5proz. Lösung von Natrium glycocholicum in eine Jugular- und in eine Mesenterialvene; Injektion in die Jugularvene vor und nach Pfortaderabklemmung.

---

[1]) Der Ikterus. Stuttgart 1891.

↓ 1 ccm 5 proz. Natr. glycochol.
Zahl der in je 5 Minuten V. jugularis
abfließenden ccm Galle: 0,8, 0,8, 1,0, 1,3, 1,0, 0,7, 0,55,
↓ 1 ccm 5 proz. Natr. glycochol.
V. mesenterica
0,45, 0,9, 1,05, 0,7, 0,55, 0,45, 0,5,
0,3, 0,15, 0,15, 0,15, 0,4, 0,6, 0,45, 05, 02, 02.
↑ Pfortaderabkl. ↑ 1 ccm 5 proz. Natr. glycochol.
V. jugularis

Die Wirkung auf die Oberflächenspannung der Galle ist für Natrium glycocholicum und cholalicum bei Zufuhr durch eine Mesenterialvene dieselbe wie nach Injektion in eine Jugularvene.

Bei Injektion von Natrium cholalicum-Lösungen in *Magen oder Duodenum* bleibt eine sichere Vermehrung der Gallenmenge nicht selten aus, die sonstigen beschriebenen Veränderungen der Gallenbeschaffenheit treten aber ein. Desoxycholsaures Natrium vermehrt in der Regel auch vom Magen und oberen Dünndarm aus die Gallenmenge; die sonstigen Eigenschaften der Galle weichen nur insofern von jenen nach intravenöser Zufuhr von desoxycholsaurem Natrium ab als die dabei auftretende intensive Färbung der Galle bei Zufuhr durch den Darm fehlt; auch wird der Harn nicht hämoglobinhaltig, was nach intravenöser Injektion gallensaurer Salze, besonders der Desoxycholsäure, häufig der Fall ist; diese Beobachtung spricht dafür, daß die cholagoge Wirkung der Gallensäuren nicht von ihrer hämolytischen abhängt, daß weiter auch das eigentümliche Verhalten der Oberflächenspannung nicht durch einen veränderten Farbstoffgehalt der Galle bedingt ist. Eine Lösung eines galletreibenden gallensauren Salzes in Serum, das nach *Bayer*[1]) und *Wieland*[2]) die hämolytische und die Wirkung auf Kreislauf und Atmung herabsetzt, wirkt übrigens ebenso stark cholagog als eine wässerige Lösung; auch Zusatz von Casein oder Cholesterin in 1 promill. Konzentration beeinflussen die galletreibende Wirkung nicht in erkennbarer Weise (s. Versuch 40 u. 41).

Die normale Gallensekretion ist in weitestem Maße *vom Nervensystem unabhängig* [*Pflüger*[3])]; dies gilt auch für die durch gallensaure Salze hervorgerufene Gallenflut. Nach Atropinisierung, nach Vagusdurchschneidung am Halse oder an der Kardia, nach Splanchnicusdurchtrennung und zwar unmittelbar im Anschluß an diesen Eingriff oder einige Tage nachher wirken die gallensauren Salze in ganz gleicher Weise wie ohne diese Eingriffe. Von einer ausführlichen Mitteilung dieser Versuchsreihe wird abgesehen.

---

1) Diese Zeitschr. **13**, 215.
2) Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **85**, 199. 1919; siehe auch **86**, 79. 1920.
3) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **2**, 191. 1869.

Versuch 40: Weibliches Kaninchen, 2150 g.

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberflächenspannung	Spez. Gewicht	Trockenrückstand			Viscosität	Bemerkungen
				in %	in g	in g für 15 Min. berechnet		
$3^h\,15'$—$4^h\,30'$	24,6	630,0	1010,5	1,36	0,3346	0,0669	101,6	
$4^h\,30'$—$5^h\,15'$	11,4	630,4	1009,5	1,33	0,1516	0,0505	101,1	
$5^h\,15'$—$5^h\,30'$	3,8							
$5^h\,30'$—$5^h\,45'$	3,8							
$5^h\,45'$—6^h	3,8							
6^h —$6^h\,15'$	3,7							
$5^h\,15'$—$6^h\,15'$	11,8	632,2	1009,4	1,35	0,1593	0,0398	102,9	Um $6^h\,15'$ werden 15 ccm einer 2proz. Lösung von Natrium cholalicum in das Duodenum injiziert.
$6^h\,15'$—$6^h\,30'$	3,7							
$6^h\,30'$—$6^h\,45'$	3,1							
$6^h\,45'$—7^h	3,0							
7^h —$7^h\,15'$	3,0							
$7^h\,15'$—$7^h\,30'$	2,8							
$6^h\,15'$—$7^h\,30'$	15,6	640,3	1009,7	1,34	0,2090	0,0425	101,6	
$7^h\,30'$—$7^h\,45'$	2,6							
$7^h\,45'$—8^h	2,5							
$7^h\,30'$—8^h	5,1	653,7	1008,8	1,46	0,0746	0,0373	108,6	

Versuch 41: Weibliches Kaninchen, 1870 g.

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberflächenspannung	Spez. Gewicht	Trockenrückstand			Viscosität	Bemerkungen
				in %	in g	in g für 15 Min. berechnet		
3^h —$4^h\,30'$	10,95							
$4^h\,30'$—$4^h\,45'$	1,55							
$4^h\,45'$—5^h	1,30							
5^h —$5^h\,15'$	1,10							
$5^h\,15'$—$5^h\,30'$	1,10							
3^h —$5^h\,30'$	16,00	625,1	1011,6	1,69	0,1704	0,0170	103,2	Um $5^h\,30'$ werden 10 ccm einer 2 proz. Lösung von desoxycholsaurem Natrium mit der Schlundsonde in den Magen eingeführt.
$5^h\,30'$—$5^h\,45'$	2,2							
$5^h\,45'$—6^h	2,3							
6^h —$6^h\,15'$	2,1							
$6^h\,15'$—$6^h\,30'$	2,0							
$6^h\,30'$—$6^h\,45'$	2,1							
$6^h\,45'$—7^h	2,0							
7^h —$7^h\,15'$	2,2							
$7^h\,15'$—$7^h\,30'$	2,0							
$7^h\,30'$—$7^h\,45'$	1,9							
$5^h\,30'$—$7^h\,45'$	18,8	627,8	1011,4	1,85	0,3478	0,0386	104,3	
$7^h\,45'$—8^h	1,7							
8^h —$8^h\,15'$	1,7							
$7^h\,45'$—$8^h\,15'$	3,4	626,7	1011,6	1,91	0,0650	0,0325	104,7	

Die *Größe der Durchblutung* ist für die sekretorische Tätigkeit der Drüsen von wesentlicher Bedeutung. Auch für die Leber gilt nach *Heidenhain*[1]) im allgemeinen, daß Steigerung der Durchblutung die Gallenmenge erhöht, wenn nicht ein Optimum überschritten wird. Die Frage, ob etwa die Gallensäuren auf dem Wege einer Steigerung der Leberdurchblutung galletreibend wirken, ist mit Nein zu beantworten, soweit es gestattet ist aus einer plethysmographischen Leberkurve in dieser Hinsicht Schlüsse zu ziehen. Die Versuchsanordnung war die von mir in früheren Versuchen[2]) angewendete; zur Kontrolle wurde stets Adrenalin intravenös injiziert, das die für dieses charakteristische Volumkurve der Leber gab.

Versuch 42: Männliches Kaninchen, 2700 g. Urethannarkose, Blutdruckschreibung, Lebervolumschreibung, Gallentropfenschreibung.

Zeit	Gallentropfen	Blutdruck	Lebervolumen (in mm über der Nullinie)	Bemerkungen
11h 1′—11h 2′	4	83	88	Um 11h 2′ wird 1 ccm einer 5 proz. Lösung von Natr. cholalic. in die Jugularvene injiziert.
11h 2′—11h 3′	5	80—60—80	81—76—82	
11h 3′—11h 4′	6			
11h 4′—11h 5′	10	88	84	
11h 5′—11h 6′	8			
11h 6′—11h 7′	8			
11h 7′—11h 8′	8			
11h 8′—11h 9′	8			
11h 9′—11h 10′	7	92	84	
11h 10′—11h 11′	4	95	84	Um 11h 10,5′ wird 1 ccm 1 proz. Adrenalinlösung i. v. injiziert.
11h 11′—11h 12′	4	170—125	98—86	
11h 12′—11h 13′	2	75	78	
11h 13′—11h 14′	2			
11h 14′—11h 15′	2	70	80	

Also auch hier eine Bestätigung der Regel, daß Blutdruck und Lebervolumen im allgemeinen parallel gehen. Mit der erhöhten Gallentropfenzahl nach Injektion von cholsaurem Natrium geht kein erhöhter Blutgehalt der Leber einher[3]).

Da nach dem Vorausgegangenen der Einfluß extrahepataler Nerven und der Durchblutung auf die Gallensekretionssteigerung ohne Bedeutung ist, liegt es nahe, eine direkte Wirkung dieser Körper auf zellige

[1]) Hermanns Handbuch d. Phys. V, 1, 209.

[2]) Diese Zeitschr. 43, 335. 1912.

[3]) Anmerkung bei der Korrektur: Nach *Rywosch* (Arbeiten aus dem pharmakol. Inst. zu Dorpat 2, 127. 1888) werden im Durchströmungsversuch an Fröschen und an der überlebenden Ochsenniere die Blutgefäße durch kleine Mengen gallensaurer Salze erweitert, durch größere verengt; eigene, wenig zahlreiche Versuche an der überlebenden Kaninchenleber in der Anordnung von *Mautner* und *Pick* sprechen gleichfalls für eine gefäßerweiternde Wirkung der gallensauren Salze am isolierten Organ.

Elemente der Leber anzunehmen; wie oben ausgeführt, kann ja auch die hämolytische Wirkung der Gallensäuren und ihre hohe Oberflächenaktivität für ihre cholagoge Wirkung nicht von ausschlaggebender Bedeutung sein. Wenn ihre Wirkung an den Zellen der Leber selbst angreift, so wäre es möglich, in der *überlebenden Leber* durch diese Substanzen die Gallensekretion anzuregen. Ob die überlebende Leber überhaupt noch Galle absondern kann, darüber liegen verschiedene Angaben vor. *Schmulewitsch*[1]) beobachtete Gallensekretion bei Einspritzung verdünnten Hundebluts in die Lebergefäße kurz vorher getöteter Kaninchen. *Schiff*[2]) ergänzte diesen Befund dahin, daß die überlebende Leber dann nicht mehr oder doch in viel geringerem Ausmaß Galle absondere, wenn man durch 1—2 Tage das Einfließen der Galle in das Duodenum verhindert hatte. *Pflüger*[3]) sah nach Injektion einer 3proz. Kochsalzlösung in die Pfortader der „postmortalen" Leber von Katzen, Hunden und Kaninchen eine starke Sekretion anfangs reiner Galle, später einer mit Kochsalzlösung verdünnten Galle. *Röhrig*[4]) fand Gallensekretion der isolierten Leber nur nach Einspritzung von defibriniertem Blut, nicht von Kochsalzlösung; ein bloßes Ausdrücken bereits vorgebildeter Galle liege also nicht vor. — In einem Versuch, in dem die Leber eines eben durch Verbluten gebildeten Kaninchens von 2500 g Gewicht von der Pfortader aus mit defibriniertem, aufs 5fache mit Ringerlösung verdünnten, arterialisierten Hammelblut von 37—38° durchspült wurde, so zwar, daß in der Minute etwa 20 ccm durch die Leber flossen, erschienen in einer in den Choledochus eingebundenen kalibrierten Glaskanüle in der ersten halben Stunde 0,3 ccm, in der zweiten halben Stunde wieder 0,3 ccm Galle. Als dann der Durchströmungsflüssigkeit soviel Natrium glycocholicum zugesetzt wurde, daß sie annähernd $1,3^{0}/_{00}$ gallensauren Salzes enthielt, stieg die Gallenmenge in den beiden nächsten halben Stunden auf 0,6 und 0,5 ccm. Als Anhaltspunkt für die Beurteilung, ob diese wie Galle aussehende Flüssigkeit wirklich Galle ist, schien die für Galle so charakteristische Größe der Oberflächenspannung verwertbar; sie betrug für das aus der Zeit vor dem Zusatz von Natriumglykocholat stammende Sekret 618,7, für die Periode nach Zusatz 648,4, für die Durchströmungsflüssigkeit entsprechend 923,2 und 699,3. Bei Fortsetzung des Versuches mit weiterer Erhöhung des Natriumglykocholatgehaltes der Durchströmungsflüssigkeit um 2 mal je 0,15% wurden in der folgenden Stunde 6,0 ccm, in weiteren 20 Minuten 6,4 ccm „Galle" geliefert, die deutlich hämoglobinhaltig und leicht getrübt war; ihre Oberflächenspannung hielt sich bei

[1]) Ber. d. Sächs. Ges. 1868, zit. nach *Schiff*, l. c.
[2]) a. a. O.
[3]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 4, 54. 1871.
[4]) Wien. med. Jahrb. 1873, S. 240.




647, die der Durchströmungsflüssigkeit betrug 691,6 bzw. 623. — In einem Versuche, in dem die Leber eines eben entbluteten Kaninchens mit Ringerlösung von 38° aus einer Höhe von 70 mm durchspült wurde, kam zunächst gar keine Galle zum Vorschein. Unmittelbar nachdem die durchlaufende Ringerlösung auf einen Gehalt von 1‰ Natriumglykocholat gebracht worden war, rückte die Galle in der kalibrierten Choledochuskanüle rasch vor, so daß nach einer halben Stunde bereits 0,9 ccm Galle geliefert waren; in der nächsten Viertelstunde wurden 2,3, in der folgenden 6,2, in den nächsten 45 Minuten 7,5 ccm Galle entleert. Die beiden ersten Portionen sahen wie Normalgalle aus, hatten eine Oberflächenspannung von 628, die folgenden, nicht mehr grün gefärbten, leicht getrübten von 694 und 672, die Durchströmungsflüssigkeit nach Zusatz von Natriumglykocholat von 602,1 und 605,6. — In einem weiteren analogen Versuche rückte die Galle bei Durchströmung mit 1 promill. Natriumglykocholat-Ringerlösung in der Kanüle langsam vor, stellte ihr Vorrücken ein bei Ersatz der Durchströmungsflüssigkeit durch eine Ringerlösung. — Die Differenzen zwischen der Oberflächenspannung der Durchströmungsflüssigkeit und der des Sekrets sprechen mit Wahrscheinlichkeit gegen eine einfache Transsudation; auch eine Begünstigung der Filtration durch die Leber unter dem Einfluß gallensaurer Salze ist kaum anzunehmen. In diesem Sinne spricht die übrigens vorauszusehende Beobachtung, daß durch 2 Filter, die in gleicher Weise derart hergestellt wurden, daß in 2 Nutschen gleichen Durchmessers dieselbe Gewichtsmenge Leberbrei, mit der Wurstmaschine oder durch Verreiben mit Seesand hergestellt, auf ein Filterpapier eingefüllt wurde, eine Lösung von 0,5% Natriumglykocholat in Ringerflüssigkeit oder in Hundeserum langsamer und mit der Dauer der Filtration immer langsamer filtriert als eine Ringerlösung oder ein Hundeserum ohne Zusatz gallensaurer Salze; bei gegenseitigem Ersatz der Filtrierflüssigkeiten wiederholt sich dieselbe Erscheinung. Unter Hinweis auf *Ellingers* und seiner Mitarbeiter Untersuchungen über Diuretica sei hier erwähnt, daß Zusatz von bis 5‰ Natriumglykocholat zu Serum dessen Viscosität nicht herabsetzt. Man wird also nicht umhin können, Vorgänge anderer Art, unter anderen auch die elektive Bindung von gallensauren Salzen durch die Leberzellen (*Bayer*), für die Erklärung der Wirkung dieser Stoffe als Cholagoga anzunehmen.

Über die Bedeutung des Dimethylhydroresorcins für die Unterscheidung flüchtiger Aldehyde in Körperflüssigkeiten.

Zugleich ein Beitrag zur Identifizierung des Formaldehyds im Harn nach Zufuhr von Urotropin.

Von

Wilhelm Stepp.

(Aus der Mediz. Universitätsklinik zu Gießen.)

(Eingegangen am 3. April 1922.)

Die von *D. Vorländer* entdeckte Eigenschaft des *Dimethylhydroresorcins* (*Dimethylcyclohexandion*), mit einfachen Aldehyden unter Bildung von gut krystallisierten Kondensationsprodukten zu reagieren, hat in den letzten Jahren mit bestem Erfolg zur Isolierung und Identifizierung des Acetaldehyds bei physiologisch-chemischen Arbeiten Verwendung gefunden. *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*[1]) benutzten das Verfahren zum Abfangen des Acetaldehyds bei der alkoholischen Zuckergärung, *W. Stepp* und *R. Feulgen*[2]) zu seiner Isolierung aus menschlichem Harn.

Wie wichtig es ist, bei Untersuchungen über das Vorkommen von Aldehyden in den Organen oder Ausscheidungen des menschlichen Körpers sich stets auch des „*Dimedonverfahrens*"[3]) zu bedienen, beweist eine Beobachtung aus jüngster Zeit, bei der ich nur durch die Anwendung dieser Reaktion vor einer groben Täuschung bewahrt wurde. Die Beobachtung sei daher an dieser Stelle kurz mitgeteilt.

Bei einem Kranken mit sekundärer Schrumpfniere im Stadium der Niereninsuffizienz wurde die tägliche Acetaldehydausscheidung mittels der von mir im Verein mit *R. Fricke* ausgearbeiteten „*Silbermethode*"[4]) fortlaufend untersucht. Anfangs entsprachen die Werte vollkommen denen, die wir bei Normalen zu finden gewohnt waren (1—2 mg im 24 Stunden-Harn). Am 10. Tag der Untersuchung trat

---

1) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. **106**, 281. 1920.

2) *W. Stepp* und *R. Feulgen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **114**, 301. 1921 und **119**, 72. 1922.

3) *Dimedon* ist die von *C. Neuberg* vorgeschlagene kurze Bezeichnung für Dimethylhydroresorcin (Dimethylcyclohexandion).

4) *W. Stepp* und *R. Fricke*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **116**, 293. 1921.

plötzlich eine Steigerung der Aldehydausscheidung ein bis auf über 9 mg, und am 13. und 14. Tage wurden Werte von über 30 mg festgestellt. In den folgenden 2 Tagen fiel die Ausscheidungskurve wieder steil ab auf normale Werte. Im *klinischen* Verhalten des Kranken konnten keine dem Verlauf der Aldehydkurve entsprechenden Besonderheiten beobachtet werden. Er bot das Bild der chronischen echten Urämie, sein Zustand verschlechterte sich in der letzten Zeit zusehends von Tag zu Tag, und 2 Tage, nachdem die Aldehydausscheidung ihren höchsten Wert erreicht hatte, trat der Exitus ein. Die *Sektion* ergab das typische Bild der *sekundären Schrumpfniere.*

Die beifolgende Tabelle gibt ein Bild der geschilderten Aldehydausscheidung.

Tabelle I.

Tag der Untersuchung	24 stündige Harnmenge	Spez. Gew.	Menge d. i. Tagesharn ausgeschied. Acetaldehyds i. mg	Bemerkungen
1	2000	1015	0,66	
2	1300	1012	1,63	
3	2500	1012	1,58	
4	1350	1012	0,89	
5	2000	1010	2,31	
6	2200	1010	1,5	
7	—	—	—	
8	2050	1010	1,35	
9	2100	1010	9,7	
10	2300	1010	8,09	3 mal tägl. 1 g Urotropin
11	2100	1010	4,62	3 „ „ 1 g „
12	2500	1008	11,00	3 „ „ 1 g „
13	2200	1010	32,91	Die Dimedonverbindung wurde aus 1700 ccm Mischharn der beiden Tage in reichlicher Menge erhalten
14	2300	1010	30,07	
15	2300	1010	11,43	
16	770 ?	?	1,32	Nachts Exitus letalis

Um zunächst den Eindruck wiederzugeben, den wir von dem plötzlichen Ansteigen der Aldehydkurve empfingen, so dachten wir natürlich an einen Zusammenhang mit der langsam fortschreitenden Niereninsuffizienz. Die Anwesenheit eines anderen Aldehyds als Acetaldehyd in Betracht zu ziehen, dafür lag vorläufig keine Veranlassung vor, da bis dahin mit Hilfe des Dimedonverfahrens im menschlichen Harn nur Acetaldehyd hatte nachgewiesen werden können. Indes bot der reichliche Aldehydgehalt des Harns (vom 9. Tage der Untersuchung ab) eine erwünschte Gelegenheit, das Kondensationsprodukt des Acetaldehyds mit „Dimedon" darzustellen und so den sicheren Nachweis zu führen, daß es sich in der Tat um Acetaldehyd handle. Ich ging in der früher beschriebenen Weise vor[1]) und erhielt reichliche Krystall-

[1]) *W. Stepp* und *R. Feulgen*, l. c.

mengen. Bei der Bestimmung des *Schmelzpunkts* fand sich jedoch zu meinem größten Erstaunen statt eines Schmelzpunktes von 138—140° ein solcher von *186—187°*, der *nach Umkrystallisieren* aus 80proz. heißem Alkohol *bei 187° konstant blieb*. Der erste Gedanke, daß vielleicht das Anhydrid der Acetaldehydverbindung vorläge, deren Schmelzpunkt bei 173—175° liegt, mußte angesichts des auch bei dem umkrystallisierten Produkt gleichbleibenden Befunds fallen gelassen werden. Überdies war die Substanz keinen Bedingungen ausgesetzt gewesen, die zur Anhydridbildung hätten Veranlassung geben können. So blieb also nichts anderes übrig, als anzunehmen, daß es sich *bei dem gefundenen Aldehyd nicht um Acetaldehyd, sondern um einen anderen Aldehyd handle*.

Das Kondensationsprodukt des *Aldols* mit Dimedon, das in unserem Laboratorium zuerst von *R. Fricke* dargestellt worden ist[1]), an das man nun zunächst denken konnte, hat einen wesentlich niedriger liegenden Schmelzpunkt (von 170—172°); auch war das Aldol bisher in menschlichen Ausscheidungen noch nicht mit Sicherheit nachgewiesen worden[2]) und schließlich konnte mit seiner Anwesenheit schon deswegen nicht gerechnet werden, weil der Aldehyd mit Wasserdampf destilliert worden war, ein Vorgehen, bei dem etwa vorhanden gewesenes Aldol sich in Crotonaldehyd verwandelt haben müßte. Denn schon bei 80—85° geht Aldol zum größten Teil in Crotonaldehyd über.

Vor allem war daher der Gedanke an Crotonaldehyd zu berücksichtigen, zumal der Schmelzpunkt seiner Verbindung mit Dimedon nach den Untersuchungen von *M. P. Neumann*[3]) dem bei unserem Präparat gefundenen sehr viel näher lag. Der *Schmelzpunkt* des „*Crotondimedons*" beträgt *183°*, *der unserer Verbindung 187°*. Zur Entscheidung der Frage, ob unsere Verbindung vielleicht noch nicht ganz rein sei, wurde eine Probe mit synthetisch dargestelltem Crotondimedon[3])[4]) gemischt und der *Mischschmelzpunkt* bestimmt. Er lag unscharf zwischen *161—167°*. Dieser Befund entschied dahin, daß eine andere Substanz vorliegen mußte. An welchen Aldehyd hatte man zu denken? Durch *H. Volkholz*[5]), einen Schüler *Vorländers*, waren für eine größere Zahl von Aldehyden die Kondensationsprodukte mit Dimethylhydroresorcin dargestellt und ihr Schmelzpunkt bestimmt worden. *Der Schmelzpunkt unserer Substanz stimmte nun genau auf die Verbindung des Formaldehyds* (*187—188°*).

---

[1]) *R. Fricke*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **116**, 129. 1921.

[2]) *R. Fricke* hat zwar in Diabetikerharn Spuren von Aldol gefunden (Zeitschr. f. physiol. Chem. **118**, 218. 1922); er läßt jedoch die Frage offen, ob nicht etwa das Aldol durch Kondensation aus Acetaldehyd entstanden sein könne.

[3]) *M. P. Neumann*, Inaug.-Diss. Leipzig 1906.

[4]) Das von mir benutzte Präparat hatte seinerzeit Herr *R. Fricke* in unserem Laboratorium dargestellt.

[5]) *H. Volkholz*, Inaug.-Diss. Halle 1902.

Wie aber sollten plötzlich so große Formaldehydmengen im Harn auftreten, nachdem Formaldehyd bisher niemals als normales oder pathologisches Stoffwechselprodukt hatte nachgewiesen werden können? Diese Frage wurde sofort geklärt, als durch Nachforschungen einwandfrei festgestellt werden konnte, daß der Patient am 9., am 10. sowie am 11 Tage. irrtümlich 3mal täglich 1 g *Urotropin* (*Hexamethylentetramin*) erhalten hatte. *Der gefundene Aldehyd war also Formaldehyd und entstammte dem aufgenommenen Urotropin.* Daß die Formaldehydausscheidung [1]) sich über mehrere Tage hin erstreckte und ihr Maximum erst in den Tagen nach Beendigung der Urotropinzufuhr erreichte, erklärt sich wohl zwanglos aus der schweren Niereninsuffizienz.

Die Dimedonmethode hat uns hier also vor einer schweren Täuschung bewahrt und wir haben gesehen, wie außerordentlich wichtig es ist, beim Nachweis von flüchtigen Aldehyden in tierischen Ausscheidungen auch stets ihre Identität sicherzustellen.

Zusammenfassung.

Bei einem Fall von sekundärer Schrumpfniere wird im Verlaufe der täglich durchgeführten quantitativen Bestimmung des Acetaldehyds im Harn ein plötzliches Ansteigen der Werte auf das 20—30fache der Norm beobachtet. Der Befund wird zunächst in Zusammenhang gebracht mit dem Fortschreiten der urämischen Erscheinungen, unter denen der Patient zugrunde geht. Die Bestimmung des Schmelzpunktes der durch Kondensation des Aldehyds mit Dimethylhydroresorcin gewonnenen Krystalle zeigt indes, daß es sich überhaupt nicht um Acetaldehyd handelt, der Schmelzpunkt spricht vielmehr für Formaldehyd. In der Tat wird nachträglich sichergestellt, daß der Patient versehentlich Urotropin (Hexamethylentetramin) erhalten hatte, dem der gefundene Formaldehyd entstammte. Es empfiehlt sich also, bei Untersuchungen über flüchtige Aldehyde sich auch stets durch Darstellung von scharf charakterisierten Derivaten (am besten in Form der Kondensationsprodukte mit Dimedon) von ihrer Natur zu überzeugen.

Ein weiteres praktisch wichtiges Ergebnis der Arbeit ist die Feststellung, daß man mittels Dimethylhydroresorcin leicht und sicher den Formaldehyd in Körperflüssigkeiten identifizieren kann.

[1]) Bei der quantitativen Aldehydbestimmung nach der „*Silbermethode*" (*Stepp* und *Fricke*, l. c.) enthält die ammoniakalische Silberlösung einen reichlichen Überschuß von Ammoniak. Man könnte nun vielleicht erwarten, daß der Formaldehyd sofort mit dem Ammoniak unter Bildung von *Hexamethylentetramin* reagiert haben würde. Das ist indes offenbar nicht in vollem Umfange der Fall gewesen, man müßte denn annehmen, daß ammoniakalische Silberlösung aus neugebildetem Hexamethylentetramin während des langen Stehens des Reaktionsgemisches wieder Formaldehyd abgespalten hätte.

Beiträge zum Studium der Giftwirkung.

Über die kombinierte Wirkung des Chinins und der Narkotica auf Invertase und über die Wirkung von Arsenverbindungen auf Maltase und α-Methylglucosidase.

Von

P. Rona, Y. Airila und **A. Lasnitzki**

(Eingegangen am 3. April 1922.)

Mit 9 Abbildungen im Text.

I.

1. Untersuchungen über die Wirkung des Chinins auf Invertase sprechen dafür, daß die Vergiftung des Fermentes, wenigstens in ihrem ersten Stadium, nach dem Typus eines Adsorptionsvorganges verläuft. Die Form der Giftkonzentration-Hemmungskurve, die Reversibilität des Vorganges, sein momentaner Verlauf, seine (verhältnismäßige) Unabhängigkeit von der Temperatur konnten in diesem Sinne gedeutet werden. Schon vor Jahren ausgeführte Versuche von *O. Meyerhof*[1]) zeigen wiederum, daß die Invertasewirkung auf Rohrzucker durch indifferente Narkotica nach dem Gesetz der homologen Reihen reversibel gehemmt wird, und daß auch hier die Annahme eines Adsorptionsvorganges begründet ist. Bei der Übereinstimmung in dem Vergiftungsmodus dieser Giftarten hatte es nun Interesse, die verschiedenen Gifte zu kombinieren und das Verhalten dieser kombinierten Wirkung des Chinins und der Narkotica auf Invertase einer Prüfung zu unterziehen.

Die Versuchsanordnung war dieselbe wie in der erwähnten Arbeit. Die Konzentration des Rohrzuckers in der Gesamtmischung betrug 5%. Die zu den Versuchen benutzte Invertaselösung wurde aus mit Essigsäure schwach angesäuerten Suspensionen untergäriger Bierhefe nach Behandlung mit Kaolin mittels Filtration gewonnen. Von dem so erhaltenen Hefeauszug wurden, je nach der Stärke des darin enthaltenen Fermentes, wechselnde Mengen benutzt. Zur Regulierung der H-Ionenkonzentration wurden Gemische von primärem und sekundärem Natriumphosphat in wechselndem Verhältnis angewendet. — Die Dauer der Einwirkung des Giftes auf das Ferment bis zum Beginn des Versuches betrug 30 Minuten; bei der kombinierten Wirkung zweier Gifte wurde das zweite nach 15 Mi-

[1]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **157**, 251. 1914.

nuten hinzugesetzt, falls die Einwirkung nicht gleichzeitig erfolgte. Chinin wurde stets in der Form des Chinin. hydrochlor. (1 proz. Lösung) benutzt (in den Versuchen stets als „Chinin" bezeichnet).

Die Spaltung des Rohrzuckers in der Gesamtmischung verlief im Wasserbade bei 30°. Sofort nach Herstellung der Gesamtmischung, ferner nach 20 und 40 Minuten wurde eine Probe von 15 oder 20 ccm entnommen und mit 3 resp. 4 ccm gesättigter Sodalösung versetzt. Als Maß für die Stärke der jeweiligen Rohrzuckerspaltung diente die polarimetrisch gemessene Abnahme des Drehungswinkels gegenüber dem Anfangswert. Der Umsatz kann, da nur die Anfangswerte der Spaltung (etwa bis 20%) in Betracht kamen, mit genügender Genauigkeit nach der Formel $\frac{x}{t}$ (x Abnahme des Drehungswinkels während der Zeit t) berechnet werden. Aus den so gewonnenen Konstanten ergibt sich die prozentuale Hemmung $= \frac{k_0 - k_h}{k_0} \cdot 100$, wo k_0 die Konstante der Reaktionsgeschwindigkeit im Kontrollversuch, k_h die im Giftversuch ist.

Nach Versuchen, in denen die hemmende Wirkung der angewandten Narkotica und des Chinins geprüft und frühere Angaben bestätigt wurden, untersuchten wir folgende Giftkombinationen in ihrer Wirkung auf Invertase: Chinin und Äthylurethan, Chinin und Isoamylurethan, Chinin und Äthylalkohol, Chinin und Propylalkohol, Chinin und Amylalkohol.

Die einzelnen Versuche sind im folgenden wiedergegeben:

Versuch 1: Kombination von Chinin und Äthylurethan.

a) Gesamtvolumen 80 ccm. Gehalt an Rohrzucker 5%. Fermentlösung 12 ccm. Puffergemisch 8,0 ccm. p_H 6,27. Chinin. hydr. molare Konzentration 0,0015. Äthylurethan molare Konzentration 0,45. Temperatur 30°. Bei der kombinierten Wirkung wird zuerst Chinin, dann (nach 15 Minuten) Äthylurethan der Fermentlösung zugefügt. k ohne Gift 0,0385, mit Chinin 0,0234, mit Äthylurethan 0,0284, mit Chinin + Äthylurethan 0,0215. — Die Hemmungen betrugen (in %) bei Chinin 39,7, bei Äthylurethan 26,2, bei beiden Verbindungen 44,1.

b) Zusammensetzung wie in a). p_H 6,06. Temperatur 31°. Bei der kombinierten Wirkung wird zuerst Äthylurethan, dann nach 15 Minuten Chinin der Fermentlösung zugefügt. k ohne Gift 0,0357, mit Chinin 0,0235, mit Äthylurethan 0,0273, mit Äthylurethan + Chinin 0,0207. — Die Hemmungen betrugen (in %) bei Chinin 34,1, bei Äthylurethan 23,5, bei beiden Verbindungen 42,0.

c) Zusammensetzung wie in a). p_H 6,18. Temperatur 31°. Bei der kombinierten Wirkung werden Chinin und Äthylurethan gleichzeitig der Fermentlösung zugefügt. k ohne Gift 0,0370, mit Chinin 0,0222, mit Äthylurethan 0,0287, mit Chinin und Äthylurethan 0,0189. — Die Hemmungen betrugen (in %) bei Chinin 39,9, bei Äthylurethan 22,3, bei beiden Verbindungen 43,5.

Wie man sieht, erfolgt in keinem Falle eine Summation beider Wirkungen, sondern die kombinierte Wirkung liegt zwar höher als die der einzelnen Gifte, aber tiefer, als sie bei Addition beider Wirkungen zustande kommen müßte. Es muß wohl eine (gegenseitige) Verdrängung beider Verbindungen angenommen werden, wobei die Adsorption des stark (schon in geringer Konzentration) hemmenden Chinins mit der des viel weniger wirksamen, in sehr bedeutend höherer molarer

Konzentration vorhandenen Urethans in Konkurrenz tritt. Entsprechend der reversiblen Natur des Vorganges ist die Reihenfolge, in welcher die Gifte mit dem Ferment in Berührung kommen, gleichgültig.

Dieselben Verhältnisse zeigen die folgenden Versuche.

Versuch 2: Kombination von Chinin und Isoamylurethan. Anordnung wie im Versuch 1. p_H 6,19. Temperatur 30°. Isoamylurethan: gesättigte Lösung, davon 27 ccm. a) Bei der kombinierten Wirkung zuerst Chinin, dann (nach 15 Minuten) Isoamylurethan. — k ohne Gift 0,0275, mit Chinin 0,0173, mit Isoamylurethan 0,0251, mit Chinin und Amylurethan 0,0178. Die Hemmungen betragen (in %) bei Chinin 37,3, bei Amylurethan 8,7, bei beiden Verbindungen 35,0. — b) Bei der kombinierten Wirkung zuerst Isoamylurethan, dann (nach 15 Minuten) Chinin. p_H 6,16. Sonst wie in a). k ohne Gift 0,0399, mit Chinin 0,0259, mit Amylurethan 0,0370, mit Amylurethan und Chinin 0,0271. Die Hemmungen betragen (in %) bei Chinin 35,0, bei Amylurethan 7,2, bei beiden Verbindungen 32,0.

Versuch 3: Kombination von Chinin und Äthylalkohol. Anordnung wie im Versuch 1. Molare Konzentration des Äthylalkohols 1,5.

a) Bei der kombinierten Wirkung zuerst Chinin, dann (nach 15 Minuten) Äthylalkohol. p_H 6,23. Temperatur 30°. — k ohne Gift 0,0373, mit Chinin 0,0225, mit Äthylalkohol 0,0282, mit Chinin und Äthylalkohol 0,0189. — Die Hemmungen betragen (in %) bei Chinin 39,6, bei Äthylalkohol 24,5, bei beiden Verbindungen 49,3.

b) Bei der kombinierten Wirkung zuerst Äthylalkohol, dann (nach 15 Minuten) Chinin. p_H 6,25. Temperatur 30°. k ohne Gift 0,0373, mit Chinin 0,0245, mit Äthylalkohol 0,0295, mit Äthylalkohol und Chinin 0,0223. — Die Hemmungen betragen (in %) bei Chinin 34,2, bei Äthylalkohol 20,8, bei beiden Verbindungen 40,0.

c) Bei der kombinierten Wirkung werden Chinin und Äthylalkohol zu gleicher Zeit zugefügt. p_H 6,26. Temperatur 30°. — k ohne Gift 0,0395, mit Chinin 0,0248, mit Äthylalkohol 0,0289, mit Chinin und Äthylalkohol 0,0210. — Die Hemmungen betrugen (in %) bei Chinin 37,4, bei Äthylalkohol 26,9, bei beiden Verbindungen 46,9.

Versuch 4: Kombination von Chinin und Propylalkohol. Anordnung wie in Versuch 1. Molare Konzentration des Propylalkohols 0,48.

a) Bei der kombinierten Wirkung zuerst Chinin, dann (nach 15 Minuten) Propylalkohol. p_H 6,25. Temperatur 30°. k ohne Gift 0,0365, mit Chinin 0,0206, mit Propylalkohol 0,0247, mit Chinin und Propylalkohol 0,0193. — Die Hemmungen betragen (in %) bei Chinin 43,5, bei Propylalkohol 32,3, bei beiden Verbindungen 47,2.

b) Bei der kombinierten Wirkung zuerst Propylalkohol, dann (nach 15 Minuten) Chinin. p_H 6,36. Temperatur 30°. — k ohne Gift 0,0352, mit Chinin 0,0206, mit Propylalkohol 0,0259, mit Propylalkohol und Chinin 0,0190. — Die Hemmungen betragen (in %) bei Chinin 41,5, bei Propylalkohol 26,4, bei beiden Verbindungen 46,0.

c) Bei der kombinierten Wirkung Propylalkohol und Chinin zugleich. p_H 6,31. Temperatur 30°. — k ohne Gift 0,0345, mit Chinin 0,0217; mit Propylalkohol 0,0266, mit Chinin und Propylalkohol 0,0195. — Die Hemmungen betragen (in %) bei Chinin 37,0, bei Propylalkohol 22,9, bei beiden Verbindungen 43,5.

Versuch 5: Kombination von Chinin und Amylalkohol. Anordnung wie im Versuch 1. Molare Konzentration des Amylalkohols (Gärungsamylalkohol) 0,23.

a) Bei der kombinierten Wirkung zuerst Chinin, dann (nach 15 Minuten) Amylalkohol. p_H 6,36. Temperatur 30°. k ohne Gift 0,0355, mit Chinin 0,0197, mit Amylalkohol 0,0282, mit Chinin und Amylalkohol 0,0235. — Die Hemmungen betragen (in %) bei Chinin 44,5, bei Amylalkohol 20,5, bei Chinin und Amylalkohol 33,8.

b) Bei der kombinierten Wirkung zuerst Amylalkohol, dann (nach 15 Minuten) Chinin. p_H 6,38. Temperatur 30°. — k ohne Gift 0,0347, mit Chinin 0,0204, mit Amylalkohol 0,0270, mit Amylalkohol und Chinin 0,0229. — Die Hemmungen betragen (in %) bei Chinin 41,2, bei Amylalkohol 22,2, bei beiden Verbindungen 34,0.

c) Bei der kombinierten Wirkung Chinin und Amylalkohol zugleich. p_H 6,34. Temperatur 30°. k ohne Gift 0,0380, mit Chinin 0,0223, mit Amylalkohol 0,0294, mit Chinin und Amylalkohol 0,0201. — Die Hemmungen betragen (in %) bei Chinin 41,3, bei Amylalkohol 22,6, bei beiden Verbindungen 47,2.

Alle Versuche sprechen in dem Sinne, daß eine Schwächung der Wirkung eines Giftes (Verdrängung) durch das Zufügen des anderen statthat. Meist liegen die Werte der kombinierten Giftwirkung nur wenig über den Hemmungswerten von Chinin; in den Versuchen mit dem äußerst stark oberflächenaktiven — im Vergleich zum Chinin wenig hemmenden — Amylalkohol und Amylurethan liegt die Hemmung bei Anwendung beider Gifte sogar etwas tiefer als bei Chinin allein (vgl. Versuch 2 u. 5, a, b). Die Reihenfolge, in der die Gifte zugefügt werden, ist belanglos. Ob Chinin zuerst und dann die Alkohole bzw. Urethane dem Fermentgemisch zugegeben werden oder beide zur gleichen Zeit, ändert an der Größe der Hemmung nichts. Die Hemmungswerte, die in Parallelversuchen erhalten worden sind, differieren im allgemeinen nur wenig. — Diese Beobachtungen sprechen also ebenfalls zugunsten der Auffassung, daß der Vergiftung in diesen Fällen ein Adsorptionsvorgang zugrunde liegt.

2. Anschließend wurde die Wirkung einiger Arsenverbindungen auf Invertase untersucht, da es wünschenswert schien, den schädigenden Einfluß bestimmter chemischer Verbindungen auf ihr Verhalten gegen verschiedene Fermente zu prüfen. Speziell bei den Arsenverbindungen liegen bereits Untersuchungen mit Urease und Lipase vor. Was die Invertase anlangt, so ist sie gegen die angewandten Arsenverbindungen so gut wie unempfindlich. So war Atoxyl, das bereits in Mengen von 0,0001 mg (in etwa 50 ccm Flüssigkeit) deutlich hemmend auf Leberlipase wirkt, gegen Invertase selbst in Mengen von 0,34 g (in 60 ccm) vollkommen unwirksam. Methylarsinoxyd, das Maltase in Dosen von 1,2—1,4 mg (in 50 ccm) bis zu 50% lähmt, übt auf Invertase in hundertmal stärkeren Dosen eine Hemmung aus, die die Fehler der Methodik nur gerade übersteigt. Ebenso liegen die Verhältnisse bei Arsensäure und Arsenigesäure, die in Konzentrationen bis 0,1 g (in 60 ccm) angewendet worden sind. Aus diesen mit den üblichen Kautelen ausgeführten Versuchen ist ersichtlich, wie individuell sich die einzelnen Fermente gegen die verschiedenen Gifte verhalten, und daß nur ein möglichst eingehendes Studium der mannigfaltigen Verhältnisse zu allgemeineren Gesetzmäßigkeiten führen kann. Auf die Wiedergabe der einzelnen Versuche soll zwecks Raumersparnis verzichtet werden.

II.

1. Bei einem anderen Vertreter der kohlenhydratspaltenden Fermente, bei der Maltase, interessierte uns die Frage, ob dieses Ferment und die α-Methylglucosidase sich verschieden gegen ein und dasselbe Gift verhalten. Daß selbst so nahe verwandte Fermente, die in ihrer fermentativen Wirkung nicht zu unterscheiden sind, auf ein Gift ganz verschieden reagieren können, zeigt das Beispiel der Leberlipase und der Serumlipase von Menschen. Während die Serumlipase bereits von 0,01 mg Chinin. hydrochl. (in 55 ccm) stark gehemmt wird, wird die Leberlipase selbst von 10 mg Chinin hydrochl. nicht beeinflußt. Ob Maltase und α-Methylglucosidase identisch sind, wurde von *E. Fischer* nicht mit Sicherheit entschieden; erst neuere Untersuchungen von *Willstätter* und *W. Steibelt*[1]) sprechen für die Verschiedenheit beider Fermente.

Zur Darstellung des Fermentes wurde untergärige Bierhefe benutzt, die in den allermeisten Versuchen nach der Vorschrift von *E. Fischer*, in einigen nach der von *Willstätter, Fr. Oppenheimer* und *W. Steibelt*[2]) behandelt wurde. Als Gifte kamen arsenige Säure, Methylarsinoxyd, Atoxyl und Arsensäure in Anwendung.

Bei den Versuchen mit *Maltase* wurde das Ferment mit und ohne Vorbehandlung mit dem betreffenden Gift verschiedene Zeiten (0, 30, 60 und 90 Minuten) im Wasserbade bei 38° mit Maltose stehengelassen, nach Ablauf dieser Zeiten von dem Gemisch 5 ccm entnommen und der *Bertrand*schen Kupferlösung zugefügt, wodurch die Fermentwirkung sofort unterbrochen wird. Dann wurde die entstandene Traubenzuckermenge nach der *Bertrand*schen Reduktionsmethode bestimmt. Die Kölbchen mit der Maltase — (a und b) bzw. Maltose — (c und d) Lösung wurden vor dem Zusammenfügen $^1/_4$ Stunde im Wasserbad vorgewärmt, und zwar enthielten a und b je 3 ccm Maltase und 6 ccm Regulatorgemisch (4 ccm n-Natriumacetat, 2 ccm $^1/_{10}$ n-Essigsäure), c und d 20 ccm 2proz. Maltoselösung, 21 bzw. 20 ccm destilliertes Wasser. In Kölbchen b kam noch 1 ccm der betreffenden Giftlösung, die mindestens $^1/_2$ Stunde lang auf das Ferment eingewirkt hatte.

Die Versuche ergaben folgendes:

Atoxyl (p_H in den verschiedenen Versuchen 5,92—6,03): hemmt in Konzentrationen von 0,017 bis 1,0 mg in 50 ccm Gesamtvolumen die Maltase gar nicht.

Arsenige Säure (p_H in den verschiedenen Versuchen 5,93—5,98): hemmt in Konzentrationen von 1,0—5,0 mg in 50 ccm Gesamtvolumen die Maltase gar nicht.

---

[1]) Vgl. Zeitschr. f. physiol. Chem. **115**, 199. 1921.
[2]) Vgl. Zeitschr. f. physiol. Chem. **110**, 232. 1920.

Arsensaures Natrium (p_H in den verschiedenen Versuchen 5,36—6,03): hemmt in Konzentrationen von 1,0—5,0 mg in 50 ccm Gesamtvolumen die Maltase gar nicht.

Methylarsinoxyd. Methylarsinoxyd wirkt stark giftig auf Maltase. Die Verhältnisse, die hier vorliegen, sind aus folgender Tabelle und den Abbildungen ersichtlich.

Tabelle I.

Versuchs-nummer	Giftmenge mg in 50 ccm	p_H	k_0	k_h	Hemmung in %
8	0,1	6,02	0,037	0,037	0
9	0,25	5,98	0,031	0,031	0
10	0,35	6,01	0,033	0,033	0
11	0,55	6,01	0,033	0,028	[13]
13	0,75	5,98	0,040	0,037	[8]
14[1])	1,0	6,02	0,043	0,033	23
15	1,0	6,01	0,037	0,030	20
16	1,0	6,01	0,028	0,016	28
17	1,1	6,02	0,037	0,023	37
18[2])	1,2	6,03	0,036	0,019	47
19	1,3	6,02	0,032	0,018	43
21	1,4	6,00	0,043	0,017	60
22	1,5	6,00	0,036	0,0145	60
23	1,6	6,02	0,047	0,013	72
24[3])	1,7	6,02	0,032	0,007	79
26	1,9	5,98	0,043	0,007	83
27	2,0	6,01	0,057	0,003	94
28	2,5	6,01	0,036	—	100
29[4])	2,5	6,01	0,036	—	100

[1]) Vgl. Abb. 1. [2]) Vgl. Abb. 2. [3]) Vgl. Abb. 3. [4]) Vgl. Abb. 4.
k_0 ist die Konstante ohne k_h mit Gift, Abscisse: Zeiten in Minuten, Ordinate: ccm Kaliumpermanganat.

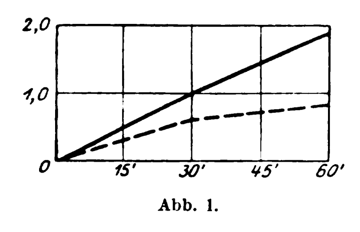


Abb. 1.

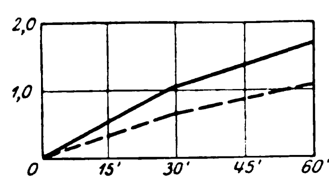


Abb. 2.

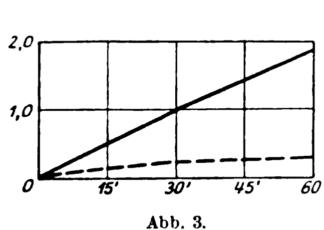


Abb. 3.

Abb. 4.

Die Abb. 5 gibt ein übersichtliches Bild der Giftwirkung. Die Zeiten sind auf der Abszisse, die (prozentischen) Hemmungen auf der Ordinate aufgetragen. Bis etwa 0,5 mg Methylarsinoxyd ist keine Hemmung nachweisbar; von da steigt sie geradlinig und steil aufwärts. Bereits bei etwa 2 mg ist totale Hemmung. Die hemmende Wirkung ist proportional der Giftkonzentration.

2. Bei den Versuchen mit α-Methylglucosid wurden jedesmal 20 ccm einer 1 proz. Lösung verwendet. Sonst waren die Versuchsbedingungen dieselben wie bei den eben beschriebenen Versuchen mit Maltose. Auch hier wurden zunächst Atoxyl, arsensaures und arsenigsaures

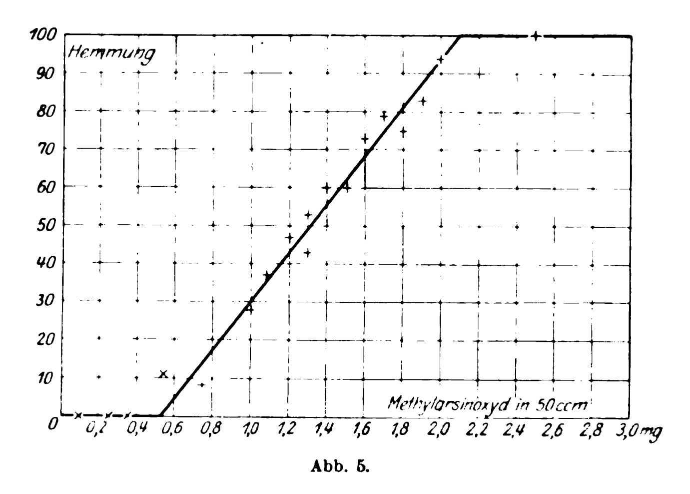


Abb. 5.

Natrium und Methylarsinoxyd in ihrer Wirkung auf die α-Methylglucosidase geprüft.

Die Versuche führten zu folgenden Ergebnissen:

Atoxyl (p_H in den verschiedenen Versuchen 6,0) hemmt in Konzentrationen von 0,01—0,1 mg (in 50 ccm Gesamtvolumen) die α-Methylglucosidase nicht.

Arsenigsaures Natrium (p_H in den verschiedenen Versuchen 6,02) hemmt in Konzentrationen von 1,0—10,0 mg (in 50 ccm Gesamtvolumen) das Ferment nicht.

Arsensaures Natrium (p_H in den verschiedenen Versuchen 5,98—6,03) hemmt in Konzentrationen von 1,0—10,0 mg (in 50 ccm Gesamtvolumen) das Ferment nicht.

Methylarsinoxyd. Methylarsinoxyd wirkt stark giftig auf die α-Methylglucosidase. Die hier vorliegenden Verhältnisse sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

Die Ergebnisse sämtlicher Versuche mit Methylarsinoxyd sind in der Abbildung 9 zusammengestellt.

Tabelle II.

Versuchs-nummer	Giftmenge mg in %	p_H	k_0	k_h	Hemmung in %
1	0,1	6,02	0,023	0,023	0
2	0,1	5,30	0,023	0,023	0
3	0,15	5,30	0,023	0,023	0
4	0,20[1])	5,95	0,027	0,025	[7]
5	0,30[2])	5,90	0,023	0,021	[8]
6	0,50	6,02	0,022	0,017	23
7	0,50	5,94	0,040	0,031	22
8	0,75[3])	5,89	0,031	0,0215	32
9	0,75	5,90	0,025	0,0185	30
10	1,0[4])	5,90	0,023	0,0145	37
11	1,25[5])	5,89	0,031	0,016	48,5
13	1,50[6])	5,95	0,027	0,093	63,0
14	1,50[7])	5,89	0,031	0,13	58
15	1,75	5,93	0,035	0,09	74
16	1,75	5,94	0,040	0,11	72
17	2,0[8])	5,90	0,023	0,06	74
18	2,25	5,93	0,033	0,04	88
19	2,50	5,94	0,040	0,04	90
20	2,75	5,90	0,025	0,02	93
21	3,00	5,00	0,025	—	100

[1]) Vgl. Abb. 6. II. [2]) Vgl. Abb. 7. IV. [3]) Vgl. Abb. 8. II. [4]) Vgl. Abb. 7. III. [5]) Vgl. Abb. 8. III. [6]) Vgl. Abb. 6. III. [7]) Vgl. Abb. 8. IV. [8]) Vgl. Abb. 7. II.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß das Methylarsinoxyd von etwa 0,3—0,4 mg an (in 50 ccm Gesamtvolumen) hemmend auf die α-Methylglykosidase wirkt; die Giftwirkung ist proportional der Giftkonzentration, und bei etwa 2,0—2,5 mg findet eine totale Hemmung statt.

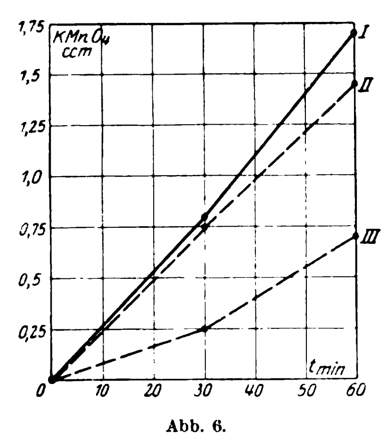


Abb. 6.

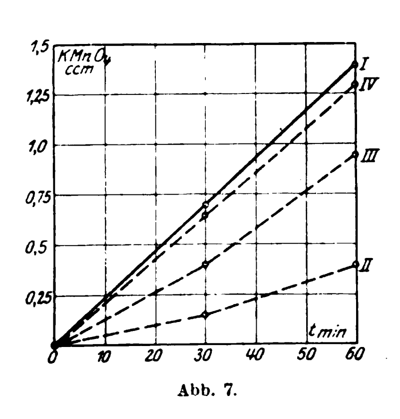


Abb. 7.

Ferner zeigen alle mit den Arsenverbindungen angestellten Versuche, daß Maltase und α-Methylglucosidase (verglichen unter denselben Bedingungen an abgespaltenem Traubenzucker gleicher Größenordnung) sich diesen Giften gegenüber, soweit die Fehler der Methodik dies

festzustellen gestatten, identisch verhalten. Eine Differenzierung beider Fermente wäre auf Grund ihres Verhaltens gegen die erwähnten Gifte nicht möglich.

Ergänzende Versuche mit Chinin. hydrochlor. (bis 20 mg in 50 ccm

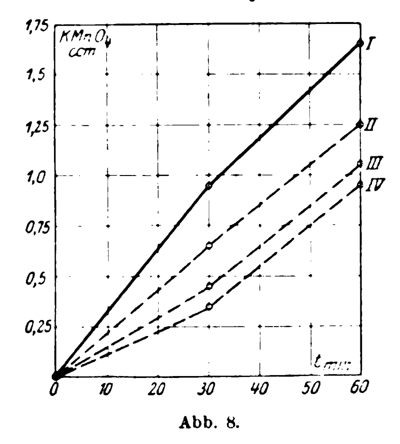


Abb. 8.

Gesamtvolumen) wie Coffein (1,0 mg) und verschiedenen Coffeinsalzen (bis 10,0 mg) ergaben, daß diese Alkaloide sowohl auf Maltase als auch auf α-Methylglucosidase unwirksam sind und auch diesen Verbindungen gegenüber die untersuchten Fermente sich gleich verhalten.

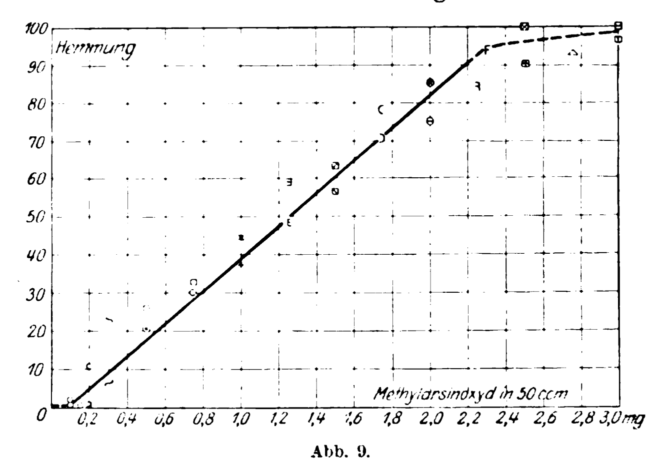


Abb. 9.

Zusammenfassung.

1. Bei der kombinierten Wirkung des Chinins und der Narkotica (aus der Alkohol- und Urethanreihe) auf Invertase war die hemmende Wirkung der Giftkombinationen auf das Ferment stets geringer als die Summe der hemmenden Wirkung der einzelnen Gifte. Es muß eine

Verdrängung der einen hemmenden Verbindung durch die andere angenommen werden.

2. Eine Reihe Arsenverbindungen (Arsensäure, arsenige Säure, Atoxyl, Methylarsinoxyd) erwiesen sich als unwirksam gegen Invertase.

3. Maltase und α-Methylglucosidase aus Bierhefe verhalten sich gegen die untersuchten Arsenverbindungen vollkommen gleich: Arsensäure, arsenige Säure, Atoxyl waren für beide Fermente unwirksam, Methylarsinoxyd wirksam.

4. Von etwa 0,3—0,5 mg (in 50 ccm Gesamtvolumen) an hemmt Methylarsinoxyd beide Fermente, bei etwa 2,0 mg war die Hemmung total. Die hemmende Wirkung ist der Giftkonzentration proportional.

5. Chinin und Coffein waren sowohl auf Maltase wie auch auf α-Methylglucosidase unwirksam.

6. Eine Differenzierung beider Fermente auf Grund ihres Verhaltens gegen die erwähnten Gifte ist nicht möglich.

Über die Produkte prolongierter tryptischer Verdauung des Caseins.

Von

Sigmund Fränkel und **Paul Jellinek.**

(Aus dem Laboratorium der Ludwig Spieglerstiftung in Wien.)

(Eingegangen am 3. April 1922.)

Bei den Arbeiten über die Verdauung des Eiweißes mittels Trypsin wurde in unserem Laboratorium die Beobachtung gemacht, daß bei sehr lange anhaltender Verdauung die Reaktion des freien Tryptophans mit Bromwasser nach *M. Nencki*[1]) wieder verschwindet. Diese Reaktion tritt erst im Verlaufe der Verdauung auf, sobald sich aus dem Eiweißkomplex freies Tryptophan abgespalten hat, erreicht nach einigen Tagen ein Maximum, an welchem Punkte gewöhnlich bei der Darstellung des Tryptophans die Verdauung abgebrochen wird, um möglichst quantitativ das Tryptophan abzuscheiden.

Wenn aber die Verdauung, wie wir es getan, weitergetrieben wird und ca. 50 Tage lang unter Zusatz weiterer Trypsinmengen läuft, so verschwindet schließlich die Tryptophanreaktion mit Bromwasser vollständig, während die Reaktion mit Glyoxylsäure und Schwefelsäure[2]), die Tryptophan auch in gebundenem Zustande anzeigt, erhalten bleibt.

Bei der Aufarbeitung der Verdauungslösung nach dieser Zeit haben *S. Fränkel* und *E. Feldsberg*[3]) die Ursache dieses Verschwindens der Bromwasserreaktion auf freies Tryptophan auffinden können. Sie stellten fest, daß das l-Tryptophan in d-Tryptophananhydrid übergeht, welches die Bromwasserreaktion nicht zeigt und daß eine zweite aromatische Aminosäure, das l-Tyrosin, unter den gleichen Bedingungen in das d-Tyrosinanhydrid übergeht.

Diese Untersuchungen beweisen also, daß das Trypsin oder ein dieses begleitendes Ferment, das nun Anhydrase genannt wird, 2 Moleküle der gleichen Aminosäure, in den bis jetzt untersuchten Fällen l-Tryptophan und l-Tyrosin, mit ihren Carboxylgruppen unter Ab-

---

[1]) B. **28**, 560. 1895.

[2]) *S. Hopkins*, Proc. of the roy. soc. of London **68**, 21.

[3]) Diese Zeitschr. **120**, 218. 1921.

spaltung eines Moleküls Wasser zu einem Anhydrid vereinigt. Dieses wurde in der Weise bewiesen, daß man die freien Aminogruppen nach *van Slyke*[1]) bestimmte und bei der *Sörensen*schen Formoltitration auf freie Säure den Nullwert bekam, während freie Aminosäuren bei gleicher Behandlung den Titrationswert der Carboxylgruppen zeigen. Interessant ist ferner, daß durch die Einwirkung dieser Anhydrase aus den beiden linksdrehenden Verbindungen, dem l-Tyrosin und l-Tryptophan, welche Eiweißbausteine sind, d-Tyrosinanhydrid und d-Tryptophananhydrid, also in beiden Fällen rechtsdrehende Produkte entstehen.

Es war nun von großer Wichtigkeit, zu erforschen, ob diese Regeln, die nach den Beobachtungen an Tyrosin und Tryptophan aufgestellt werden konnten, nämlich, daß bei langer Trypsinverdauung die Aminosäuren in ihre Anhydride übergehen, welche das entgegengesetzte optische Verhalten zeigen, und daß an der Bildung des Anhydrids sich immer zwei Moleküle der gleichen Aminosäuren beteiligen, nur für diese zwei Aminosäuren gilt oder ob sie für die aus dem Eiweiß abgespaltenen Aminosäuren allgemeine Gültigkeit hat.

Zu diesem Zwecke haben wir versucht, das Verdauungsprodukt, aus dem vorerst nur das Tyrosin und Tryptophan als Anhydride isoliert waren, weiter aufzuarbeiten.

S. Fränkel und *E. Feldsberg* haben nach dem Abscheiden der Tryptophanquecksilberverbindung das von Schwefelsäure durch Calciumcarbonat befreite und neutralisierte Filtrat im Vakuum eingeengt und den sich ausscheidenden Körper als d-Tyrosinanhydrid identifiziert. Wir erhielten durch weiteres Einengen der Mutterlauge und Versetzen mit Alkohol wieder eine weiße Substanz, die sich in blättrigen Krystallen abschied. Der im experimentellen Teil genau beschriebene Körper erwies sich als rein organisch und gab keine Millonreaktion. Aus den bei den Verbrennungen gefundenen Werten berechneten wir $C_5H_9NO_3$, welche Formel mit der des Oxyprolin (Oxypyrrolidincarbonsäure) übereinstimmt. Da der Pyrrolnachweis, Rötung eines mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspanes durch die Dämpfe des erhitzten Körpers, gelang und der Schmelzpunkt unserer Substanz mit dem des von *E. Fischer* aus Gelatine[2]) und Casein[3]) dargestellten Oxyprolins übereinstimmte, war die Identität unseres Körpers erwiesen. Es zeigt also dieser Befund, daß bei der Trypsinverdauung l-Oxyprolin nicht in das Anhydrid übergeht.

Die Oxypyrrolidincarbonsäure wurde zuerst von *E. Fischer* im Leim nachgewiesen und vermittels der Esterifizierungsmethode, die wir im folgenden ausführlicher beschreiben, dargestellt und beschrieben[2]).

---

[1]) *van Slyke*, Journ. of biol. chem. **9**, 185. 1911.

[2]) B. **35**, 2660. 1902.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, 157. 1903.

Auch bei der Darstellung aus Casein verfährt er auf dieselbe umständliche Art[1]) und erhält in beiden Fällen nur geringe Ausbeuten. Er erhielt von 1 kg Casein ausgehend nur 2—3 g Oxyprolin, wir erreichten die fast 4fache Ausbeute und konnten den Körper sofort in reinster Form isolieren, so daß unsere Methode als neues sehr einfaches Verfahren zur Darstellung des Oxyprolins zu betrachten ist.

E. Fischers Darstellungsmethode, die von *H. Leuchs* und *H. Felsner*[2]) etwas modifiziert wurde, ist in kurzem folgende:

Käufliche Gelatine wird nach Vertreibung des Wassergehaltes mit konzentrierter Salzsäure durch 6stündiges Kochen am Rückflußkühler hydrolysiert[3]) und durch Lösen des beim Eindampfen erhaltenen Sirups in absolutem Alkohol und Behandeln mit Salzsäure, die Aminosäuren verestert. Nachdem man dann, um die Chlorhydrate der Ester zu zerlegen, mit Kaliumcarbonat alkalisch gemacht, werden die Aminosäureester mit Aether ausgeholt. Nach dem Ausäthern der letzteren bleibt eine dickbreiige dunkle Masse, welche Kalisalze, ferner die Diaminosäuren, den Rest der Monoaminosäuren und das Oxyprolin enthält. Sie wird in Wasser gelöst, mit Salzsäure schwach übersättigt, auf dem Wasserbade eingedampft und die auskrystallisierenden Salze durch Filtration entfernt. Zum Schlusse wird der Sirup mit dem gleichen Volumen Alkohol, der etwas gasförmige Salzsäure enthält, versetzt, die Mutterlauge im Vakuum verdampft, der Rückstand nochmals mit salzsäurehaltigem Alkohol behandelt und abermals verdampft. Damit die Monoaminosäuren möglichst entfernt werden, ist es nötig, den Rückstand wieder wie zuerst mit Alkohol und Salzsäure zu verestern und dieselbe Operation, d. h. Abscheidung der Ester mit Kaliumcarbonat, Ausäthern usw. zu wiederholen. Der Rückstand, welcher die Salze, Diaminosäuren und einen Teil der Oxypyrrolidincarbonsäure enthält, wird wieder in Wasser gelöst, mit Salzsäure übersättigt und unter zeitweiser Filtration der ausgeschiedenen Salze bis zum Sirup eingeengt. Durch wiederholtes Auslaugen desselben mit salzsäurehaltigem Alkohol und Eindampfen lassen sich die anorganischen Salze fast völlig entfernen. Der schließlich verbleibende Sirup, in dem die Aminosäuren als Hydrochloride enthalten sind, wird nun, statt wie es *Fischer* vorschreibt, mit Silbersulfat, von *Leuchs* und *Felsner* durch Kochen mit Bleioxyd vom Chlorwasserstoff befreit. Das gelöste Blei wurde durch Schwefelsäure größtenteils ausgefällt, hierauf mit Phosphorwolframsäure versetzt, welche die Diaminosäuren fällte. Die wässerige Mutterlauge wird zur Entfernung der Phosphorwolframsäure mit überschüssigem Bariumhydroxyd und mit Kohlensäure behandelt und das Filtrat genau mit Schwefelsäure gefällt.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, 157. 1903.
[2]) B. **41**, 1731. 1908.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 72. 1902.

Dadurch wurden auch die letzten Spuren des gelösten Bleis niedergeschlagen. Das Filtrat wurde nun unter vermindertem Druck ziemlich weit eingedampft und dann mit Methylalkohol versetzt. Dieser ließ ein Gemenge von reinweißen krystallisierten Aminosäuren fallen, das in der Hauptsache aus Oxyprolin bestand, welches durch Umkrystallisieren aus Wasser rein erhalten wurde.

Der so erhaltene Körper schmeckte in wässeriger Lösung stark süß, welcher Umstand *E. Fischer* auf eine Oxypyrrolidin-α-carbonsäure schließen ließ[1]).

Unser Oxyprolin, welches wir als *Racemkörper* erhalten haben, hinterläßt einen bitterlichen Geschmack.

Es ist nämlich interessant, daß *Fischer* aus der Gelatine eine stark linksdrehende Verbindung erhält. Das optische Verhalten des aus Casein gewonnenen Körpers beschreibt er nicht näher. *Unsere Verbindung erwies sich als optisch inaktiv. Wir haben also das dl-Oxyprolin gefunden.*

Die Schmelz- resp. Zersetzungspunkte der von *E. Fischer* aus Leim und Casein gefundenen und unseres Körpers sind die gleichen. Es ist also entweder bei der prolongierten Verdauung oder (was unwahrscheinlicher) bei der Darstellung das l-Oxyprolin racemisiert worden.

Die vom Oxyprolin und dem zugesetzten Alkohol befreite Lösung wurde nun mit Sublimat behandelt. Die auf diese Weise erhaltene Fällung wurde vom Filtrate getrennt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt und der aus der von Quecksilbersulfid befreiten Lösung auf die gewöhnliche Art gewonnene Körper bis zur Schmelzpunktskonstanz umkrystallisiert und getrocknet. Die Menge der auf diese Weise dargestellten Substanz war so gering, daß sie gerade für eine Mikrokohlenwasserstoff- und Stickstoffbestimmung ausreichte. Wir fanden nun, daß die so erhaltenen Werte für Stickstoff und Kohlenstoff mit den für ein *Histidinanhydriddichlorhydrat* berechneten innerhalb der Fehlergrenzen übereinstimmen. Die letzten Spuren unseres Körpers verbrauchten wir für den Halogennachweis nach *Beilstein*, der auch deutlich gelang.

Die Möglichkeit einer solchen Anhydridbildung des Histidins in der Weise, daß 2 Aminosäuremoleküle mit ihren Carboxylgruppen unter Abspaltung eines Moleküls Wasser zusammentreten, ist im Verlaufe der protrahierten Trypsinverdauung sehr wahrscheinlich, da dieses Verhalten heterocyclischer Aminosäuren bei der gegebenen Versuchsanordnung in den beiden von *S. Fränkel* und *E. Feldsberg* gefundenen Fällen am Tyrosin und Tryptophan studiert wurde.

Es wird nun in einer parallelen Arbeit, vom reinen Globin ausgehend, welches im Gegensatze zum Casein sehr histidinreich ist, der hier in kleinen Mengen beobachtete Körper dargestellt und beschrieben werden.

[1]) *W. Sternberg*, Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. S. 367. 1899.

Das Filtrat der Quecksilberfällung aus saurer Lösung wurde nun mit Soda alkalisch gemacht und weiter Sublimat zugesetzt, wodurch wir einen voluminösen weißen Niederschlag erhielten. Derselbe wurde wieder durch Schwefelwasserstoff zerlegt und die vom Quecksilber und überschüssigem Schwefelwasserstoff befreite Lösung im Vakuum bis zur beginnenden Krystallbildung eingeengt. Durch fraktionierte Krystallisation und mehrmalige Behandlung der einzelnen Fraktionen mit Alkohol gelang es uns, die beiden so erhaltenen Körper quantitativ zu trennen, da sich der eine Körper als in Alkohol vollkommen löslich zeigte, während es der andere nur in ganz geringem Maße war. Dieser letztere Körper erwies sich als rein anorganisch, sublimierte restlos und wurde durch qualitative Analyse als *Chlorammon* erkannt.

Dieser Befund, daß bei der tryptischen Verdauung sich aus Eiweiß Ammoniak abspaltet, ist durchaus neu. Er korrespondiert völlig mit der Erfahrung, daß aus den Eiweißkörpern durch eingreifende komplette Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure Ammoniak in einer für jeden Eiweißkörper charakteristischen Menge abgespalten wird. Dieses Ammoniak stammt höchstwahrscheinlich aus den Dicarbonsäuren, Glutaminsäure und Asparaginsäure, mit denen es ursprünglich im Eiweißmolekül in Säureamidform gebunden anzusehen ist[1]).

Die zweite in der alkalischen Sublimatfällung gefundene Substanz, die sich zum Unterschied von Chlorammon durch ihre Löslichkeit in Alkohol gewinnen ließ, wurde nun durch Einengen aus der alkoholischen Lösung erhalten. Es waren blättrige, durchsichtige Krystalle, welche die Isonitrilreaktion gaben. Auch die Probe auf ein Chlorhydrat mit Silbernitrat fiel positiv aus. Der Körper zeigte sich hygroskopisch und bei längerem Stehen an der Luft zerfließlich, welche Eigenschaft die Analyse sehr erschwerte und erst nach Konstanttrocknen und Einwägen in geschlossenen Gefäßen richtige Resultate zuließ. Aus den Werten der Elementaranalyse und Chlorbestimmung nach *Volhard* berechneten wir die Formel CH_6NCl. Nach Bestimmung des Schmelz- und Zersetzungspunktes unseres Körpers und Vergleich der gefundenen Werte zeigte es sich, daß wir *Methylaminchlorhydrat* erhalten hatten. Auch der in der Literatur[2]) beschriebene Schmelzpunkt des Methylaminpikrates war mit dem der von uns dargestellten Pikrinsäureverbindung unseres Körpers identisch.

---

[1]) *van Slyke*, Journ. of biol. chem. **11**, 20. 1911; **43**, 3170. 1910. — *Osborne* und *Harris*, Journ. of the Americ. chem. soc. **25**, 323. 1903. — *Osborne*, *Leavenworth* und *Brautlacht*, Americ. Journ. of physiol. **23**, 194. 1908.

[2]) *Delépine*, Ann. de chim. et de phys. **7**, 461. 1896. — *Ristenpart*, B. **29**, 2530. 1896.

Das Vorkommen des Methylamins wurde bisher im Kraute von Mercurialis annua oder M. perennis[1]), in der Heringslake[2]), im Harn von Hunden nach Fleischfütterung[3]) und im rohen Holzgeist neben Di- und Trimethylamin[4]) nachgewiesen.

Doch dürfte das Methylamin in diesen Fällen aus dem Cholin stammen, was aber hier nicht in Betracht kommt.

Die Bildungsweise des Methylamin im Verlaufe der protrahierten Trypsinverdauung könnte man sich auf 2 Arten erklären. Entweder durch die Abspaltung einer methylierten Aminosäure und deren weiteren Abbau durch das Trypsin oder durch Decarboxylierung des Glykokolls. Da die erste Annahme dadurch, daß methylierte Aminosäuren bisher unbekannt und speziell ihr natürliches Vorkommen bei irgendwelchen physiologischen Prozessen noch nicht nachgewiesen werden konnte, unwahrscheinlich erscheint, liegt nunmehr die Möglichkeit nahe, das von uns gefundene Methylamin als Decarboxylierungsprodukt des Glykokolls aufzufassen. In diesem Falle wäre nun eine neue Funktion des tryptischen oder eines dieses begleitenden Fermentes als *Decarboxylase* gefunden. Es ist nicht anzunehmen, daß hier eine Decarboxylierung durch Fäulnisbakterien vorliegt, da ja sonst auch andere proteinogene Amine hätte gefunden werden müssen, wie etwa im Secale cornutum oder bei der Coligärung von Eiweißkörpern bzw. ihrer Spaltprodukte.

Die Vermutung, daß ein so weitgehender Abbau von Eiweißkörpern, wie bei uns über Glykokoll bis zum Methylamin möglich und auf fermentative Wirkung zurückzuführen sei, wurde schon in den in unserem Institute vorgenommenen Arbeiten über die Aminosäuren im Secale cornutum von *S. Fränkel* und *J. Rainer*[5]) ausgesprochen, doch kamen die diesbezüglichen Arbeiten, die dann von *Friedmann* fortgesetzt wurden, zu keinem für unseren Fall anwendbaren befriedigenden Abschluß.

Wohl ist es schon gelungen, Aminosäuren durch gewisse Bakterienarten auf diese Weise abzubauen. Beispielsweise wurde das Imidazolylalanin, Histidin, durch Fäulnis mit dem Bacillus coli communis[6]) decarboxyliert und so das Imidazoläthylamin, Histamin, erhalten.

---

[1]) *Reichhardt*, Jahresber. üb. d. Fortschr. d. Chemie 1863, S. 457; 1868, S. 754. — *Schmidt*, Liebigs Ann. d. Chem. **193**, 73.

[2]) *Tollens*, Zeitschr. f. Chem. 1866, S. 516. — *Bocklisch*, B. **18**. 1922.

[3]) *Schiffer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **4**, 245.

[4]) *Vincent*, Jahresber. üb. d. Fortschr. d. Chemie 1873, S. 686. — *Lorin*, Jahresber. üb. d. Fortschr. d. Chemie 1873, S. 687; Bull. de la soc. chim. de France **2**, 19.

[5]) Diese Zeitschr. **74**, 167. 1916.

[6]) *Ackermann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**, 504. 1910. — *Koessler* und *Hanke*, Journ. of biol. chem. **39**, 521, 539. 1919.

Doch ist weder ein solcher Abbau des Glykokoll noch die decarboxylierende Wirkung des tryptischen Fermentes bei der Verdauung bisher bekannt.

Zusammenfassung.

Wir haben also die von *S. Fränkel* und *E. Feldsberg* begonnene Arbeit, die bei der protrahierten tryptischen Verdauung entstehenden Eiweißspaltprodukte zu erfassen und zu bestimmen, fortsetzend, 4 weitere Körper zu isolieren vermocht, von denen wir nur 3 in genügender Menge erhielten, um sie eindeutig bestimmen zu können. Das erste Ergebnis dieser Arbeit war die Entdeckung eines neuen sehr einfachen Verfahrens zur Darstellung von Oxyprolin, die deshalb von Wert zu sein scheint, da dieser Körper bisher nur auf viel umständlichere und weniger ökonomische Art, wie an der von *Fischer* gefundenen und von *Leuchs* verbesserten Darstellungsmethode gezeigt wurde, gewonnen werden konnte. Der von uns durchgeführte Nachweis von freiem Ammoniak war deshalb von Interesse, da er die tiefeingreifende Wirkung des tryptischen Fermentes auf die Eiweißspaltprodukte, in diesem Falle hauptsächlich auf die Amide der Aminodicarbonsäuren, bei protrahierter Verdauung zeigte. Schließlich konnten wir nun durch Darstellung des Methylamin eine neue Funktion des pankreatischen Fermentes, die Fähigkeit Carboxylgruppen abzuspalten, beobachten, welche Wirkung vorher an keiner im Prinzipe unseren Versuchen ähnlichen Arbeit nachgewiesen werden konnte. Den von uns gefundenen, als Histidinanhydriddichlorhydrat anzusprechenden Körper konnten wir nicht völlig studieren, obwohl gerade dieser ein Analogon zu den von *S. Fränkel* und *E. Feldsberg* gefunden Substanzen allem Anscheine nach ist, da bei unserem Versuche mit Casein nur sehr wenig Substanz resultierte.

Darstellung des racemischen Oxyprolin.

Casein wird mit 0,8 proz. Sodalösung mit Trypsin unter Zusatz von Chloroform und Toluol durch ungefähr 50 Tage bis zum Verschwinden der Bromwasserreaktion auf freies Tryptophan verdaut, filtriert, mit Schwefelsäure die Lösung auf 10% Säuregehalt gebracht und mit einer Mercurisulfatlösung in Schwefelsäure die Lösung ausgefällt. Im Filtrat wird das Quecksilber mit Schwefelwasserstoff, die Schwefelsäure mit Baryt oder Kalk, zum Schlusse mit dem Carbonat des Baryums oder Calciums niedergeschlagen und filtriert, bis zur beginnenden Krystallisation eingeengt und das auskrystallisierende Tyrosinanhydrid abgesaugt. Hierauf versetzt man mit einem der Mutterlauge gleichen Volumen Alkohol, läßt auskrystallisieren und krystallisiert das so erhaltene Oxyprolin aus heißem Wasser, wenn nötig, nach Entfärbung mit Tierkohle um.

Experimenteller Teil.

Wir setzten unsere Verdauung nach der von *S. Fränkel* und *E. Feldsberg*[1]) ausgearbeiteten Vorschrift ebenfalls von 500 g reinstem dänischen Casein ausgehend, an, schwemmten in 5 Liter 0,8 proz. Sodalösung auf, setzten 2 g Pankreatin zu, schüttelten mit Chloroform und überschichteten mit Toluol, um Fäulnis zu vermeiden. Hierauf wurde die Lösung im Thermostaten bei 37° stehengelassen und der Verlauf der Verdauung durch die Bromwasserreaktion von Zeit zu Zeit kontrolliert. Nachdem diese ungefähr nach 10 Tagen ihr Maximum erreicht hatte, ließen wir die Verdauung noch 50 Tage weitergehen, während welcher Zeit wir das Abnehmen der Tryptophanreaktion an mehrmaligen, der Lösung entnommenen Proben deutlich erkennen konnten. Nach dieser Zeit zeigte die Verdauungsflüssigkeit, mit Bromwasser nach Ansäuerung mit Essigsäure versetzt, keine Reaktion mehr.

An diesem Punkte wurde die Verdauung unterbrochen, die Lösung vom Toluol im Scheidetrichter befreit und von den festen Rückständen abfiltriert. Nun wurde mit konzentrierter Schwefelsäure neutralisiert, wieder filtriert und mit 10proz. Quecksilbersulfatlösung in 5volumproz. Schwefelsäure versetzt und stehengelassen. Der nach 24 Stunden ausgeschiedene gelbliche Niederschlag wurde abfiltriert und durch die Adamkiewicz-Hopkinsreaktion als das schon gefundene und beschriebene Tryptophananhydrid identifiziert. Hierauf wurde die Lösung durch weiteres Hinzufügen von Quecksilbersulfat, bis dasselbe keine Fällung mehr zeigte, vom Tryptophankörper vollends befreit.

In das Filtrat wurde nun Schwefelwasserstoff eingeleitet und das ausfallende Quecksilbersulfid quantitativ entfernt. Nach Entfernung des überschüssigen Schwefelwasserstoffes durch Durchleiten von Luft wurde die Lösung mit Calciumcarbonat neutralisiert und vom ausfallendem Calciumsulfat durch Filtrieren, welches jedesmal nach mehrmaligem Einengen im Vakuum wiederholt werden mußte, befreit. Der beim weiteren Einengen im Vakuum auskrystallisierende Körper wurde abfiltriert und durch die *Millon*sche Reaktion und den Schmelzpunkt (273°) als das von *S. Fränkel* und *E. Feldsberg* gefundene d-Tyrosinanhydrid erkannt. Als nun die Lösung beim weiteren Einengen auf ca. 250 ccm keine Neigung zum Krystallisieren zeigte, versetzten wir mit dem gleichen Volumen Alkohol. Sofort trübte sich die Flüssigkeit und schied nach längerem Stehen eine grauweiße Substanz ab, die durch Absaugen von der Mutterlauge getrennt und mit Alkohol mehrmals gewaschen wurde. Hierauf wurde sie in heißem Wasser gelöst und nach Entfärbung mit Tierkohle abermals mit einem der Lösung gleichen Volumen Alkohol versetzt. Nunmehr schied sich nach einigen Stunden ein weißer Körper

---

[1]) Diese Zeitschr. **120**, 218. 1921.

in fettig glänzenden Blättchen ab, die sich in Wasser als schwer benetzbar erwiesen. Dieser Körper wurde zur Konstanz getrocknet und schmolz, in der geschlossenen Capillare erhitzt, bei 270° unter Zersetzung. Auf dem Platinblech erhitzt, erwies sich die Substanz als flüchtig. Die Dämpfe hatten den für viele Aminosäuren charakteristischen Geruch nach Fleischextrakt und färbten einen mit Salzsäure benetzten Fichtenspan rötlich, (Pyrrolreaktion). Die Verbrennungen der vaccuumtrockenen Substanz ergaben folgende Resultate:

7,027 mg	Substanz	4,379 mg H_2O	11,790 mg CO_2
6,747 „	„	4,094 „ „	11,320 „ „
3,850 „	„	0,400 ccm N (15°, 738 mm)	
3,140 „	„	0,280 „ „ (15°, 750 „)	

Berechnet für $C_5H_9NO_3$ (Oxyprolin):

C: 45,80% H: 6,87% N: 10,69%
gef.: C: 45,79%, 45,77%; H: 6,79%, 6,98%; N: 10,70%, 10,72%.

Da die bei der Elementaranalyse gefundenen Werte mit den für *Oxypyrrolidincarbonsäure* berechneten übereinstimmten und wir durch die schon erwähnte Fichtenspanreaktion sicher waren, ein Pyrrolderivat vor uns zu haben, so erschien die Identität unseres Körpers genügend erwiesen. Auch der Schmelzpunkt unserer Substanz stimmte, wie wir schon in der Einleitung der Arbeit erwähnten, mit dem des von *E. Fischer* dargestellten *Oxyprolin* überein.

Untersuchung der optischen Aktivität in wässeriger Lösung.

(Mikropolarisation nach *E. Fischer.*)

E. Fischer stellt eine 9,328 proz. Lösung des Oxyprolin in Wasser dar und findet im 2 cm-Rohr bei Natriumlicht eine Linksdrehung von 15,60°. $[\alpha]_D^{20}$ – 81,04.

Wir bereiteten durch Lösen von 0,5 g Oxyprolin in 5 ccm Wasser eine 10 proz. Lösung, untersuchten ebenfalls im 2 cm-Rohr, doch ergab sich der Drehungswert Null. Wir hatten also einen *Racemkörper* erhalten, dessen Vorkommen als Eiweißspaltling in der Literatur noch nicht beschrieben ist, da *Fischer* das optische Verhalten seines aus Casein gewonnenen Oxyprolins nicht untersucht hat.

In Wasser gelöst hinterließ unser Körper auf der Zunge einen bitterlichen Geschmack.

Die Gesamtausbeute des reinen Körpers betrug über 4 g, d. i. 0,8%.

Die vom Oxyprolin befreite alkoholhaltige wässerige Lösung wurde nun auf dem Wasserbade eingeengt, mit Wasser versetzt und abermals eingeengt und dieser Vorgang so oft wiederholt, bis aller Alkohol vertrieben war. Nunmehr wurde mit wässeriger Sublimatlösung versetzt. Die Lösung trübte sich sofort und nach einiger Zeit hatte sich ein weißlicher Niederschlag auf dem Boden des Glases abgesetzt. Nun

wurde wieder Sublimatlösung zugefügt, bis ein weiterer Zusatz keine Trübung mehr zeigte. Der Quecksilberniederschlag wurde nun durch Abzentrifugieren von der Lösung getrennt und mehrmals auf der Zentrifuge mit Wasser nachgewaschen.

Diese Quecksilberfällung aus saurer Lösung wurde vorerst beiseitegestellt und die von ihr durch Zentrifugieren befreite Lösung mit Natriumhydroxyd alkalisch gemacht und gehalten und weiter mit Sublimat versetzt, bis bei einem neuerlichen Zusatz dieses Reagens gelbes Mercurioxyd ausfiel. Während dieses Vorganges hatte sich ein voluminöser weißer Niederschlag abgesetzt. Dieser wurde ebenfalls auf der Zentrifuge abgeschleudert und die darüberstehende Flüssigkeit abgegossen und für spätere Arbeiten aufbewahrt.

Nunmehr schritten wir an die Aufarbeitung des ersterhaltenen Niederschlages aus der salzsauren Lösung. Derselbe wurde in Wasser aufgeschlämmt und durch 10stündiges Einleiten von Schwefelwasserstoff zerlegt. Die abgeschiedene Quecksilberfällung wurde abfiltriert, abermals in Wasser aufgeschlämmt und mit Schwefelwasserstoff auf gleiche Weise behandelt. Die beiden nunmehr von Quecksilber befreiten Filtrate wurden durch Durchleiten von Luft von überschüssigem Schwefelwasserstoff befreit und im Vakuum eingeengt, bis sich aus den vereinten wässerigen Lösungen, die jetzt ca. 20 ccm Volumen hatten, ein grauweißer Körper abzuscheiden begann. Wir versetzten wieder mit ca. 50 ccm Wasser, destillierten dasselbe wieder im Vakuum bis auf ca. 25 ccm ab und wiederholten diesen Vorgang so lange, bis wir ihn vom größten Teil der überschüssigen Salzsäure befreit hatten, was wir durch das Verschwinden des scharfen Geruches unserer Lösung erkannten. Nun wurde auf dem Wasserbade eingeengt, wobei sich geringe Mengen des schon erwähnten grauweißen Körpers abschieden. Dieselben wurden abfiltriert, in heißem Wasser gelöst und die anfangs etwas trübe und angefärbte Lösung nach Klärung durch Kochen mit Tierkohle auskrystallisieren gelassen. Der so erhaltene Körper, dessen Gesamtausbeute nur ca. 0,01 g betrug, wurde nun zur Konstanz getrocknet. Wir konnten davon nur 2 Schmelzpunkte, einen Kohlenwasserstoff und eine Stickstoffbestimmung, machen. Die von diesen Bestimmungen übriggebliebenen letzten Spuren des Körpers zeigten deutlich, in Wasser gelöst, die Silberreaktion auf Chlorion, welcher Umstand auf ein Chlorhydrat hinwies.

4,014 mg Substanz: 5,813 mg CO_2 1,506 mg H_2O
1,822 „ „ 0,360 ccm N (18°, 755 mm).

Unsere Analysenresultate kommen den für ein *Histidinanhydriddichlorhydrat* berechneten Werten am nächsten.

Berechnet für $C_{12}H_{18}N_6O_3Cl_2$:
C: 39,45% H: 4,93% N: 23,00%
gef.: C: 39,59% H: 4,20% N: 23,00%

Zersetzungspunkt in der Capillare 285°.

Die aus alkalischer Lösung gefällte Quecksilberverbindung wurde durch Aufschlämmen mit Wasser gewaschen, dann abzentrifugiert und dieser Vorgang so oft wiederholt, bis die überstehende Flüssigkeit, von der wir jeweils Proben auf einem Uhrglase am Wasserbade abdampften, keinen Trockenrückstand hinterließ, also von den Natriumsalzen gereinigt erschien. Hierauf wurde der Quecksilberniederschlag in ca. 3 Liter Wasser aufgeschlämmt und durch 2 Tage langes Einleiten von Schwefelwasserstoff zerlegt und vom abgeschiedenen Quecksilbersulfid abfiltriert. Dieser Vorgang wurde, wie bei der ersten Sublimatfällung wiederholt, die Filtrate vereinigt und wie früher vom Schwefelwasserstoff befreit. Die Lösung wurde im Vakuum eingeengt und auf die schon besprochene Art von der überschüssigen Salzsäure befreit. Als bei einem Volumen von ca. 100 ccm eine weiße Substanz auszukrystallisieren begann, wurde die Destillation unterbrochen und der Inhalt des Kolbens mit heißem Wasser herausgespült und mit Tierkohle entfärbt. Wir dampften auf dem Wasserbade wieder auf ca. 100 ccm ein, bis sich leichter Krystallansatz zeigte. Hierauf wurde die Flüssigkeit einen Tag auf Eis stehengelassen. Es hatten sich nach dieser Zeit durchsichtige federförmige Krystalle angesetzt, die durch scharfes Absaugen von der Mutterlauge getrennt wurden. Dieselben wurden getrocknet und erwiesen sich beim Erhitzen auf dem Platinblech als vollkommen flüchtig, ohne zu verkohlen. Mit Kupferoxyd gemischt und geglüht konnte durch Barytwasser keine entweichende Kohlensäure nachgewiesen werden. Mit Lauge gekocht, entwickelten sich reichlich Ammoniakdämpfe und ein Zusatz von Silbernitrat gab Chlorsilberfällung. Dadurch war der Körper als *Chlorammon* erkannt.

Die Mutterlauge wurde hierauf mit 20 ccm Alkohol versetzt und einen Tag stehen gelassen. Wieder krystallisierte Chlorammon, welches wir an den schönen federförmigen Krystallen erkannten, aus. Nunmehr wurde die Mutterlauge auf dem Wasserbade vollends eingedampft und der Trockenrückstand mit wenig Alkohol behandelt, in welchem sich der größte Teil löste. Der Rückstand war Chlorammon, dessen Gesamtausbeute ca. 7 g betrug. Die alkoholische Lösung wurde im Vakuum über Chlorcalcium einen Tag stehengelassen, die abgeschiedenen blättrigen durchsichtigen Krystalle von der Mutterlauge durch Absaugen getrennt und diese wieder im Vakuum, bis aller Alkohol verschwunden war, belassen. Da beide Krystallfraktionen gleiches Aussehen hatten und wie sich später zeigte, gleiche Eigenschaften, wurden sie vereinigt, wodurch wir im ganzen ca. 5 g dieses Körpers erhielten. Der Körper gab mit Chloroform und alkoholischem Kali versetzt die Isonitrilreaktion, auch konnte man Salzsäureion wie früher nachweisen. Erst nach 4stündigem Trocknen bei 115° erreichten wir Gewichtskonstanz, doch nahm der Körper an der Luft stehend in kurzer

Zeit merklich an Gewicht zu und zerfloß, wie wir an einem Teile der Substanz wahrnehmen konnten, nach längerer Zeit durch Wasseraufnahme. Wir mußten daher den konstant getrockneten Körper immer im Vakuum über Chlorcalcium halten und machten die zu den Verbrennungen nötigen Einwagen in geschlossenen Gefäßen. Erst so erhielten wir nach mehreren Fehlanalysen übereinstimmende, richtige Resultate:

6,285 mg	Substanz:	4,067 mg CO_2	5,11 mg H_2O
7,060 „	„	4,587 „ „	5,634 „ „
2,205 „	„	0,396 ccm N	(16°, 748 mm)
2,850 „	„	0,507 „ „	(14°, 739 „)
2,524 „	„	0,454 „ „	(15°, 739 „)

Die Chlorbestimmung wurde nach *Volhard* durch Titration mit $^n/_{100}$-Lösungen von Silbernitrat und Rhodanammon vorgenommen.

Einwage: 2,528 mg	verbraucht	10,00 ccm	$^n/_{100}$-Silber	— 6,26 ccm $^n/_{100}$-Rhodan
daher:	„	3,74 „	„	d. i. 1,328 mg Cl.
Einwage: 5,025 mg	„	15,00 „	„	— 7,43 ccm $^n/_{100}$-Rhodan
daher:	„	7,47 „	„	d. i. 2,652 mg Cl.

Berechnet für CH_6NCl:

	C: 17,78%	H: 8,89%	N: 20,74%	Cl: 52,59%
gef.:	C: 17,64%	H: 9,10%	N: 20,73%	Cl: 52,51%
„	C: 17,72%	H: 8,93%	N: 20,88%	Cl: 52,71%

In der Capillare erhitzt, schmolz die Substanz, die dadurch als mit *Methylaminchlorhydrat* identisch anzusehen ist, bei 226° unter Zersetzung.

Wir lösten ferner ca. 0,5 g unseres Körpers in 5 ccm Wasser, setzten ein gleiches Volumen wässeriger Pikrinsäure zu und reinigten den nach einigen Stunden auskrystallisierenden Körper, der gelbe Nadeln bildete, durch scharfes Absaugen und Waschen mit kaltem Wasser von der Mutterlauge. Das Pikrat schmolz in der Capillare bei 207°, welcher Schmelzpunkt als der des Methylaminpikrates in der Literatur bereits angegeben wurde.

Über die Einwirkung des Selens auf den Bau- und Betriebsstoffwechsel der Pflanze bei Anwesenheit der Radioaktivität der Luft und des Bodens.

Von

Julius Stoklasa,

unter Mitwirkung *P. Křička*, *J. Pěnkava*, *J. Zelenka*, *J. Chmelař* und *V. Jánský*.

(Aus der Staatlichen Versuchsstation an der Böhmischen technischen Hochschule in Prag.)

(Eingegangen am 5. April 1922.)

Seit der Entdeckung des Selens durch *Berzelius* aus dem Bleikammerschlamm der Gripsholmer Schwefelsäurefabrik im Jahre 1817 wurde dem Selen vom physiologischen Standpunkte aus nur eine sehr geringe Aufmerksamkeit geschenkt.

Das Selen kommt in der Natur oft jedoch immer in ganz geringen Quantitäten vor. Nach meinen Forschungen ist es stets in den Exhalationen der Vulkane enthalten. Im Jahre 1906 habe ich nach den Vesuveruptionen Gelegenheit gehabt, das Selen neben sublimierten Schwefel beim Krater zu finden. Das Selen ist aber fast immer im Schwefelkies und in den radioaktiven Mineralien vorhanden. Wie bekannt dient dieser zur Herstellung der Schwefelsäure, weshalb jene immer Selen enthält.

Namentlich die Gloversäure ist infolge ihres Gehaltes an Selen oft blutrot gefärbt. Ich führe die Daten über Selengehalt der Gloversäure und Kammersäure an:

Gloversäure	60,5° = B	enthält in 1 kg	26—58 mg	Selen
Kammersäure	50,0° = B	„ „ 1 „	15—42 „	„

Diese Untersuchungen habe ich noch in meiner praktischen Tätigkeit in der chemischen Fabrik *Peček* vor 28 Jahren ausgeführt.

Die Schwefelsäure wird, wie bekannt, zur Herstellung der Super- sowie Ammoniumsulfate benützt und deshalb ist in den vielen angewendeten Düngemitteln immer eine kleine Quantität Selen zu finden. Nicht nur bei Rösten der Schwefelkiese während der Schwefelsäure- sowie Sulfitcellulosefabrikation, sondern auch bei Hüttenwerken, Ultramarin-, Glasfabriken und Ziegeleiringöfen sowie Kalköfen entstehen immer geringe Quantitäten von Selenverbindungen, welche in die Luft entweichen. Durch die Verbrennung der Kohle in allen Fabriken so auch im Haushalte wird ebenfalls Selendioxyd produziert. Durch die Verbrennung des Schwefelkieses bilden sich nicht nur das Schwefeldioxyd und Selendioxyd, sondern es ent-

steht auch evtl. durch Einfluß des Schwefeldioxyds auf das Selendioxyd das Selen. Auch in den Rauchgasen von Lokomotiven der Eisenbahnen befindet sich nicht nur Selendioxyd, sondern auch Selensäure. Die minderwertige Kohle, welche reich an Pyrit und Markasiten ist, wird auf Halden geworfen. Bekanntlich brennt auf diesen die Kohle, dabei bilden sich aus den Pyriten und Markasiten Schwefeldioxyd und es entsteht unter Verbrennung das Selendioxyd, evtl. elementares Selen.

Wir haben die Flora in der Umgebung von den brennenden Halden in Falkenau, Brüx, Dux, Teplitz und bei Lany näher untersucht und gefunden, daß die Blätter der Achillea Millefolium, Plantago media, Rumex acetosa und Taraxacum officinale eigentümlich gelbrote Farbe aufweisen.

Durch mikrochemische und chemische Untersuchungen wurde es uns möglich, das Selen in den Palisadenzellen nachzuweisen und zwar haben wir im Zellinhalt Körnchen von ausgeschiedenem Selen gefunden[1]). Auch durch rein chemisches Verfahren haben wir die Anwesenheit des Selens bestätigt. Wenn wir in Betracht ziehen, was für große Quantitäten Kohlen, in welchen selenhaltiges Kies eingesprengt ist, jährlich verbrannt werden, so müssen wir bestimmt annehmen, daß das Selen in der Atmosphäre sich vorfindet. Natürlich sind dies sehr kleine Quantitäten, welche sich nicht mit voller Sicherheit konstatieren lassen. *Wir müssen dem Selen vom biochemischen Standpunkte aus eine große Aufmerksamkeit widmen, nachdem das Selendioxyd eine außerordentlich toxische Eigenschaft besitzt.* Durch unsere Untersuchungen wurde festgestellt, daß man im Super- und Ammoniumsulfat tatsächlich Selen vorfindet, namentlich wenn man zur Aufschließung der Rohphosphate oder entleimten Knochenmehle die Gloversäure benutzt, welche oft sehr reich an Selen ist. Es wurde von uns festgestellt, daß 1 kg Superphosphat 11—25 mg, das Ammoniumsulfat 15—36 mg Selen enthält.

Bei Anwendung von Superphosphat und Ammoniumsulfat wird dem Boden immer eine gewisse Menge Selen zugeführt. Nimmt man an, daß 100 kg Superphosphat durchschnittlich 2 g Selen enthalten, so wird dem Boden durch 400 kg Superphosphat pro Jahr und ha 8 g Selen zugeführt. Ziehen wir noch in Betracht, daß neben Superphosphat auch Ammoniumsulfat angewendet wird, in welchem gleichfalls in 1 kg 15—36 mg Selen vorkommt, so wird durch Anwendung von 200 kg Ammoniumsulfat der Boden mit 5 g Selen bereichert. Zusammen mit Superphosphat macht dies 13 g Selen aus. Manchmal enthält Superphosphat noch größere Quantitäten Selen, namentlich wenn man zur Aufschließung der Phosphate eine selenreiche Gloversäure benützt hat.

---

[1]) Bei der Resorption der Selenverbindungen durch die Pflanze werden die Blätter der letzteren nach einiger Zeit rotgelb. Mikrochemische Untersuchungen lassen erkennen, daß die Selenverbindungen durch das Protoplasma der Zelle reduziert wurden und das Selen sich in Form rötlicher Körnchen im Cytoplasma vorfindet.

Kalkuliert man bloß mit dem jährlichen Quantum des Selens, welches evtl. bei Anwendung von 400 kg Superphosphat und 200 kg Ammoniumsulfat dem Boden zugeführt wird, so kommt die Menge von 13 g Selen mit mindestens 4 000 000 kg Boden bei einer Tiefe von 25—30 cm zusammen. Auf 1 kg Boden kommt also 0,000003 g Selen in Form von Selensäure. Diese Konzentration ruft aber keine toxische Wirkung auf den Keimprozeß der Samen und auf den Bau- und Betriebsstoffwechsel der Pflanze hervor.

Wir haben vorausgesetzt, daß das zugeführte Selen durch die biochemischen Prozesse zu Selensäure oxydiert wird. Diese kleinen Quantitäten Selens, die wir vorgefunden haben, können eher eine stimulierende Wirkung auf die Vegetation hervorrufen. In der Tat können wir auf Grund unserer Experimente erklären, daß ganz kleine Quantitäten Selens in Form von Selensäure stimulierend auf die Bildung neuer lebender Pflanzenmasse einwirken.

Das Selen wird im Boden unter Einwirkung von Ozon, Wasserstoffsuperoxyd, salpetriger Säure und Salpetersäure, namentlich bei Gegenwart aktiver Bakterien, zu Selensäure oxydiert.

In dieser Beziehung haben wir Experimente ausgeführt und zwar in der Weise, daß wir in einem Erlenmeyerkolben 1 kg Lehmboden mit 100 g frischen Pferdeexkrementen gemischt haben und dazu 1,5—2 g feingemahlenes Selen zusetzten. Der Boden enthielt stets während der Versuchszeit 25% Wasser. Täglich wurde durch den Boden ein starker Luftstrom 10 Stunden lang durchgeleitet. Nach 80—100 Tagen konnte man schon im konzentrierten Bodenextrakt die Selensäure deutlich nachweisen.

In einem Boden, welcher mit Superphosphat und Ammoniumsulfat reichlich gedüngt wird, kann eine verhältnismäßig größere Anhäufung von Selen evtl. Selensäure stattfinden. Es ist eine volle Analogie zwischen Selen und Schwefel.

H. Clay Lint[1]) hat nämlich gefunden, daß innerhalb 8—9 Wochen der gesamte dem Boden zugeführte elementare Schwefel durch Bakterien zu Schwefelsäure oxydiert worden war. Die Geschwindigkeit der Oxydation erwies sich als abhängig von der Bodenfeuchtigkeit. Aus den Untersuchungen von *W. Thörner*[2]) ist zu entnehmen, daß der sog. reaktionsfähige Schwefel nicht nur als Schwefelkies im Boden vorkommt, sondern auch in Form von freiem Schwefel, sowie auch vielleicht als organisch gebundener Schwefel. Dieser ist unschädlicher Natur, solange er sich unter dem Grundwasserspiegel befindet, wird aber der Moorboden umgearbeitet und der Grundwasserspiegel gesenkt, so tritt durch den Luftsauerstoff die Oxydation des Schwefels ein; es entsteht Schwefelsäure. *Totigham* und *Hart*[3]) haben ebenfalls die Umwandlung des Schwefels im Boden studiert und gefunden, daß dieser durch die biochemischen Prozesse des Bodens in Schwefelsäure übergeht.

[1]) *H. Clay Lint*, Zeitschr. f. angew. Chemie 1915, S. 153.
[2]) *W. Thörner*, Zeitschr. f. angew. Chemie 1916, S. 29, 33.
[3]) *Totigham* und *Hart*, Soil science **11**, 49—65. Madison, Univ. of Wisconsin.

Diese Erscheinungen sind von hoher Bedeutung, nachdem neben der Schwefelsäure und dem Ferrosulfat, wie wir beobachten konnten, auch Selensäure bei Anwesenheit des Selens entsteht.

Als Schädigungsfaktor für das Pflanzenwachstum kommt in erster Linie das Schwefeleisen als Schwefelkies (und rhombisch krystallisiert als Markasit) in Betracht, welches als eine der verbreitetsten Ausscheidungen bei der Moorbildung in Böden unter den Gesteinen vorkommt. In den Mooren selbst ist das Schwefeleisen weniger anzutreffen als in dem unterliegenden Sande und an der Grenze zwischen organischer Ablagerung und Untergrund. Wenn Schwefelkies verwittert, entsteht unter Oxydation und Aufnahme von Wasser schwefelsaures Eisenoxydul (Eisenvitriol) und freie Schwefelsäure ($FeS_2 + O_2 + H_2O = FeSO_4 + H_2SO_4$).

Über die physiologische Wirkung des Selens auf die chlorophyllose und chlorophyllhaltige Zelle.

Über die physiologische Wirkung des Selens haben wir schon im Jahre 1908 mit Versuchen in unserem Laboratorium begonnen und ich verweise auf die in meinem Institute ausgeführten Arbeiten von *Jánský*, *Němec*, *Káš*, und inletzter Zeit von *Božo Turina* (siehe Biochem. Zeitschr.). Leitende Motive hierbei waren für uns einerseits die Wirkung des Selens in seiner elementaren Form auf den Pflanzenorganismus, andererseits die toxischen Wirkungen von Seleniten und Selenaten zu erforschen. Diese Versuche haben wir bei An- und Abwesenheit der Radioaktivität durchgeführt. Selen ist ein Element, welches vom physikalischen und chemischen Standpunkte eine große Aufmerksamkeit verdient.

Es ist bekannt, daß durch Belichtung die elektrische Leitfähigkeit des Selens vermehrt wird.

Nach der zuerst von *Siemens*[1]) aufgestellten und von *Hesehus*[2]) weiter entwickelten Hypothese der „allotropischen Dissoziation“ des Selens wird die elektrische Leitfähigkeit des gutleitenden metallischen Selens, welches unter dem Einflusse des Lichtes und der Wärme aus dem schlechtleitenden krystallinischen Selen entsteht, der Anwesenheit freier Ionen zugeschrieben, deren Zahl unter dem Einflusse des Lichtes schnell zunimmt. Schon *Himmstedt* hat auf die merkwürdigen Eigenschaften des Selens hingewiesen und dasselbe bereits vor 22 Jahren mit Radium verglichen. Wir finden in der Tat, daß das Selen unter dem Einfluß

---

[1]) *Siemens*, Annalen der Physik und Chemie, herausgeg. von J. C. Poggendorf, Leipzig 1824—1873. Von 1877—1899 von Wiedemann, von 1900 ab Drudes Annalen. Pogg. **156**, 334. 1875; **159**, 117. 1876; Wied. Ann. **2**, 521. 1877. — Derselbe, The Chemical News **51**, 261 u. 310. 1885. — Derselbe, Jahresber. üb. d. Fortschr. d. Chemie 1875, S. 113; 1876, S. 121; 1877, S. 159; 1885, S. 248.

[2]) *Hesehus*, Journal de la Société physico-chimique russe, St-Pétersbourg **15**, 125 u. 146. 1883; **35**, Phys. Teil S. 661. 1903; **37**, Phys. Teil S. 221. 1906; Wied. Ann. Beibl. **8**, 859. 1884; Physikal. Zeitschr. (Riecke u. Simon) **7**, 163. 1906. *Ruhmer*: Das Selen und seine Bedeutung für Elektrotechnik. 1902.

des Lichtes in dem Sinne eine Veränderung erleidet, indem sich eine andere Modifikation dieses Elementes, die den elektrischen Strom gut leitet, bildet.

Wie die Änderung der Leitfähigkeit den Anlaß geboten hat, die Phototropie des Selens zu erforschen, so wurde man durch eine charakteristische Farbenänderung zahlreicher organischer Substanzen auf deren Phototropie aufmerksam. Die bei der Belichtung dieser chromotropen Verbindungen auftretenden Erscheinungen mögen an dem Beispiel des Triphenylfulgids

$$\begin{array}{l}(C_6H_5)C = C-CO \\ C_6H_5 \cdot HC = C-CO\end{array} \rangle O$$

erläutert werden.

Wenn man diese Substanz lange Zeit hindurch belichtet, so geht sie in eine chemisch von ihr verschiedene isomere Form über, die sich in das ursprüngliche Fulgid nicht zurückverwandelt. Es ist auch interessant, die Wirkung der verschiedenen Spektralfarben auf Selen zu beobachten. Von den Spektralfarben wirken die aktinischen am schwächsten, die roten und ultraroten am stärksten Das Maximum scheint nahe bei dem Ort des thermischen Maximums zu liegen[1]). Die dunklen Wärmestrahlen und die chemisch wirksamen Strahlen sind von sehr geringem Einfluß; dagegen ist die Wirkung ungefähr proportional der Helligkeit und ihr Maximum liegt daher im Grünlichgelb des Spektrums.

Durch Röntgenstrahlen wird der Widerstand des Selens in derselben Weise wie durch Lichtstrahlen vermindert[2]). Der Widerstand eines *Siemens*schen Selenpräparates nimmt bei der Beleuchtung mit phosphoreszierenden Substanzen, die durch verschieden starke Lichtquellen erregt waren, mit der Intensität dieser Lichtquellen ab. Alkoholische Lösungen einiger Pflanzen- und Tierfarbstoffe 5 cm Abstand verringern den elektrischen Widerstand ebenso wie Bestrahlung mit Licht-, Radiumstrahlen usw.[3]). Nach den physiologischen Untersuchungen von *Czapek* und *Weil*[4]) zeigen die Symptome der Selen- und Tellurvergiftungen bei Kalt- und Warmblütern große Ähnlichkeit mit den nach Applikation von Arsen beobachteten. Selen und Tellur treten in ihren Verbindungen zwei-, vier- und sechswertig auf. *Czapek* und *Weil* haben nämlich gefunden, daß an Warm- und Kaltblütern die Selenate und Tellurate schwächer wirken als die Tellurite und Selenite. Nach den Angaben dieser Forscher wirkt Natriumselenit in Mengen von 4 mg pro kg, subcutan Kaninchen, Hunden, Katzen appliziert, binnen wenigen Stunden. Das selensaure Na wirkt erst in der 5fachen Menge in gleicher Weise letal. Bei Fröschen beträgt die Dosis letalis weniger als 1 mg. Über den Einfluß auf den gesamten Stoffwechsel hat ebenfalls *Modica*[5]) Versuche ausgeführt.

Die Selenverbindungen werden, wie *Rosenheim*[6]) gefunden hat, durch gewisse Schimmelpilze zersetzt und zwar unter Auftreten eines skatol- oder mercaptanähnlichen Geruchs.

Über die Verbreitung des Selens in der Natur, namentlich über das Vorkommen und über die quantitative Bestimmung des Selens in pflanzlichen und tierischen Objekten hat einige Arbeiten *Th. Gassmann*[7]) publiziert. *Th. Gassmann*[8]) hat im

[1]) *Sale*, Proc. of the roy. soc. of London **21**, 283. 1873; Annalen der Physik u. Chemie, herausgeg. von J. C. Poggendorf **150**, 333. 1873; Jahresber. üb. d. Fortschr. d. Chemie 1873, S. 130.

[2]) *Perreau*, Cpt. rend. **129**, 956. 1899.

[3]) *Griffiths*, Cpt. rend. **137**, 647. 1903.

[4]) *Czapek* und *Weil*, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **32**. 1893.

[5]) *Modica*, Ann. Chem. Farm. **25**. 1897.

[6]) *Rosenheim*, Proc. Chem. Soc. **18**. 1902.

[7]) *Th. Gassmann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **97**. 1916; **98**. 1917.

[8]) *Th. Gassmann*, Helvetica Chimica Acta. Volumen I, Fasciculus 1. 1918.

Jahre 1918 behauptet, daß das Selen in der Natur sehr verbreitet ist. Die Resultate der Untersuchungen von *Gassmann*, daß in Schrotmehl, Gemüsearten, gelben Rüben, Salat, Spinat und Kartoffeln Selen vorkommt, weiter, daß das Selen überhaupt als sicherer Bestandteil dem Menschen-, Tieren- und Pflanzenorganismus zuzuzählen ist, verlangt eine strenge Nachprüfung. Nach den Ansichten von *Winterstein* und *Fritsch*[1]) aus dem Agrikulturchemischen-Laboratorium der Eidgenössischen technischen Hochschule in Zürich erscheinen die Anschauungen von *Gassmann* sehr zweifelhafter Natur, was auch *P. Karrer* bestätigt. Dieser äußerte sich über das Vorkommen von Selenwasserstoff im Regen und Schnee wie folgt: „*Th. Gassmann* hat vor kurzem eine Mitteilung in dieser Zeitschrift veröffentlicht, in welcher ausgeführt wird, daß Selen im Regenwasser und Schnee vorhanden ist. Anläßlich eines Vortrags von Herrn Dr. *Gassmann* in der Züricher chem. Gesellschaft bezweifelte Prof. *Winterstein* auf Grund eigener Nachprüfung die Angaben, daß Selen im Wasser und in Pflanzen vorkommt. Auch ich habe hierauf die Angaben von *Th. Gassmann* genau nach den von ihm gegebenen Vorschriften kontrolliert. Dabei hat sich ergeben, daß *Th. Gassmann* einem bedauerlichen Irrtum zum Opfer gefallen ist. Die von ihm in sehr kleiner Menge erhaltenen „Niederschläge' enthalten kein Selen. Es ist also nicht fraglich, daß Selen weder im Schnee noch Regenwasser vorkommt."

Über die Pharmakologie des Selens und Tellurs, namentlich über die Wirkung ihrer Säuren auf Bakterien, hat in jüngster Zeit *Joachimoglu*[2]) neue Versuche angestellt und konnte dabei beobachten, daß die selenige Säure auf die Entwicklung der Bakterien mehr toxisch wirkt als die Selensäure. Er hat eine Konzentration von Selen in Form von 1 : 20 000 angewendet.

In unserem Institute haben *A. Němec* und *V. Káš*[3]) Versuche über den Einfluß des Selens auf die Entwicklung einiger Schimmelpilze aus der Gattung Penicillium ausgeführt.

Ob eine Anhäufung von Selen resp. Selensäure im Boden stattfindet, kann man nicht genau konstatieren. Durch unsere Vegetationsversuche wurde festgestellt, daß das Selen in Form von Selensäure von dem Wurzelsystem der Pflanze resorbiert wird. Es wurde tatsächlich das Selen im Organismus der Pflanze gefunden *und zwar in dem Wurzelsystem und auch in den Blättern* mikrochemisch nachgewiesen. Infolgedessen wird in jedem Jahre eine gewisse Quantität Selen von dem Wurzelsystem der Pflanze aufgespeichert.

Unsere Studien über den Einfluß des Selenions auf den Aufbau neuer lebender Bakterienmasse sowie die Keimung der Samen und Entwicklung der Pflanze haben wir in nachstehende Abteilungen eingeteilt:

a) Die Wirkung des Selenions auf den Aufbau neuer lebender Masse des Azotobakters bei An- und Abwesenheit der Radiumemanation.

b) Einfluß des Selenions auf die Keimung der Samen bei An- und Abwesenheit der Radiumemanation.

---

[1]) *Winterstein* und *Fritsch*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **104**, H. 1. 1918; weiter **109**. 1920.

Bemerkung: Für diese Angaben bin ich meinem hochverehrten Kollegen *Winterstein* zu Dank verpflichtet.

[2]) *G. Joachimoglu*, diese Zeitschr. **107**, H. 4—6. 1920.

[3]) *A. Němec* und *V. Káš*, diese Zeitschr. 1921.

c) Einfluß des Selenions auf die Entwicklung der Pflanzen bei An- und Abwesenheit der Radiumemanation.

I. Über die Wirkung des Selenions auf den Aufbau neuer lebender Masse des Azotobakters bei An- und Abwesenheit der Radiumemanation.

Der Azotobacter chroococcum gehört, wie bekannt, zu den interessantesten Mikroben, welche die Fähigkeit besitzen, elementaren Stickstoff zu assimilieren und für den Aufbau ihrer Zellen zu verwenden. Von allen bis jetzt bekannten Bakterienarten, bei welchen die Eigenschaft der Assimilation des Luftstickstoffs sichergestellt worden ist, zeigt der Azotobacter chroococcum *Beijerinck* die größte diesbezügliche Assimilationspotenz.

Bevor ich zur Behandlung einzelner Kapitel schreite, ist es notwenig, zu betonen, daß Selen in seinen verschiedenen Modifikationen von uns angewendet wurde, um zu erforschen, wie diese auf das Wachstum der Bakterien wirken. Wir verwendeten amorphes Selen, weiter rotes krystallisiertes Selen und graues krystallinisches oder metallisches Selen, welches durch Erwärmen der vorerwähnten Form entsteht. Alle diese 3 Formen Selens ließen keine toxischen Wirkungen auf das Wachstum der Bakterien in einer Konzentration von 0,001—0,01 Atomgewicht Selen in 1 Liter reinem, destilliertem Wasser wahrnehmen. Dies war jedoch bei einer höheren Konzentration, und zwar bereits bei 0,10 und namentlich bei 0,25 Atomgewicht Selen nicht mehr der Fall und es zeigten sich nachteilige Wirkungen auf das Wachstum der Bakterien. 0,01 Atomgewicht Selen hat jedoch keine toxische Wirkung auf die Entwicklung der Bakterien während 75 Versuchstagen ausgeübt. Aus dem Grunde haben wir bei unseren Versuchen nicht das reine Selen, sondern Selenite und Selenate verwendet.

Stickstoffgewinnung durch Reinkulturen des Azotobakters.

Azotobacter chroococcum *Beijerinck* wurde in flüssigem Nährboden behufs Stickstoffgewinnung in nachstehender Weise kultiviert. *Fernbach*sche Kolben von 25 cm Bodendurchmesser wurden mit 250 ccm Nährlösung gefüllt, die eine dünne Schicht am Boden bildeten. Zu diesem Versuche benützten wir Nährlösungen mit und ohne Natriumselenit von folgenden Zusammensetzungen:

I.

1000 ccm Moldauwasser, 20 g Mannit, 0,5 g Dikaliumphosphat und 0,000001 bis 0,00001 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenit.

II.

Diese Nährlösung hatte dieselbe Zusammensetzung wie die vorerwähnte, blieb jedoch ohne Selenzusatz.

Nach gründlicher Sterilisation in strömendem Dampf, und zwar im Autoklav, wurden am 3. Tage nach der vorerwähnten Sterilisation die Kolben mittels einer Platinöse mit einer frischen Reinkultur von Azotobakterkultur geimpft, und zwar

wurden 10 der Kolben geimpft. Das Impfmaterial wurde Strichkulturen entnommen, die auf Mannitbodenextrakt-Agar angelegt waren. 3 der Kolben wurden nochmals sterilisiert und als blinde Kolben für die chemische Analyse benützt.

Bei dem blinden Kolben wurde überhaupt keine Trübung sichtbar. Wir trieben Luft, und zwar mit oder ohne Selengehalt, durch die *Fernbach*schen Kolben über die Oberfläche der Flüssigkeit. Bei einer anderen Serie der Versuche wurde wieder Radiumemanation über die Flüssigkeit durchgeleitet, und zwar in den *Fernbach*schen Kolben mit und ohne Selen. Bei allen mit Azotobakter geimpften Kolben ohne Selen in Form von Selenit, bei welchen die Luft durchgetrieben wurde und wo namentlich die Radiumemanation zur Wirkung kam, zeigte sich an der Oberfläche eine charakteristische, perlmutterartig glänzende Membran, welche durch die mikroskopische Untersuchung als Reinkultur von Azotobakter festgestellt wurde. Bei dieser Gruppe wurde eine ungemein starke Vermehrung der Bakterien auch beobachtet. Nach einer Versuchsdauer von 14 Tagen wurde die Reinheit der Kultur geprüft und die chemische Analyse des Inhaltes einzeln bei jedem Kolben durchgeführt. Der Stickstoffgehalt wurde nach *Kjeldahl-Wilfarth* ermittelt.

I. Serie der Versuche.

4 *Fernbach*sche Kolben mit Nährlösung ohne Selen, bei welchen bloß die Luft über die Oberfläche durchgeleitet wurde, haben nach 14 Tagen im Durchschnitte aufgewiesen:

Gesamtstickstoff pro 1 Liter	103,0 mg
Stickstoffgehalt der Nährlösung vor dem Versuche pro 1 Liter	4,5 „
Stickstoffgewinn pro 1 Liter	98,5 mg

II. Serie der Versuche.

Bei dieser Gruppe wurde radioaktive Luft über die Oberfläche der Kolben durch 14 Tage getrieben. Diese Luft hatte 41,7 ME., d. h. $16\,721 \cdot 10^{-12}$ $= 0{,}0000167$ mg Ra aufgewiesen.

Gesamtstickstoffgehalt pro 1 Liter	188,9 mg
Stickstoffgehalt der Nährlösung pro 1 Liter vor dem Versuche	5,3 „
Stickstoffgewinn pro 1 Liter	183,6 mg

III. Serie der Versuche.

Bei dieser Gruppe hat man Selen in verschiedenen Konzentrationen angewendet, und zwar 0,000001—0,00001 Atomgewicht Se in Form von Natriumselenit und über die Oberfläche der Flüssigkeit wurde bloß Luft geleitet.

A.

Nährlösung mit Konzentration 0,000001 Atomgewicht Selen.

Gesamtstickstoffgehalt pro 1 Liter	98,8 mg
Stickstoffgehalt der Nährlösung vor dem Versuche pro 1 Liter	5,8 „
Stickstoffgewinn	93,0 mg

B.

Nährlösung mit Konzentration 0,0000025 Atomgewicht Selen.

Gesamtstickstoffgehalt pro 1 Liter	99,5 mg
Stickstoffgehalt der Nährlösung vor dem Versuche pro 1 Liter	5,8 „
Stickstoffgewinn	93,7 mg

C.

Nährlösung mit Konzentration 0,000005 Atomgewicht Selen.

Gesamtstickstoffgehalt pro 1 Liter	80,6 mg
Stickstoffgehalt der Nährlösung vor dem Versuche pro 1 Liter . . .	5,8 „
Stickstoffgewinn	74,8 mg

D.

Nährlösung mit Konzentration 0,0000075 Atomgewicht Selen.

Gesamtstickstoffgehalt pro 1 Liter	64,4 mg
Stickstoffgehalt der Nährlösung vor dem Versuche pro 1 Liter . . .	5,8 „
Stickstoffgewinn	58,6 mg

E.

Nährlösung mit Konzentration 0,00001 Atomgewicht Selen.

Gesamtstickstoffgehalt pro 1 Liter	43,6 mg
Stickstoffgehalt der Nährlösung pro 1 Liter vor dem Versuche . . .	5,8 „
Stickstoffgewinn	37,8 mg

IV. Serie der Versuche.

Bei dieser Gruppe hat man denselben Vorgang wie bei der III. Serie nur mit dem Unterschied eingehalten, daß man über die Flüssigkeit anstatt der reinen die radioaktive Luft, und zwar mit einer Aktivität 41,7 ME., d. h. $16\,721 \cdot 10^{-12}$ = 0,0000167 mg Ra durch 14 Tage leitete.

A.

Nährlösung mit Konzentration 0,000001 Atomgewicht Selen.

Gesamtstickstoffgehalt pro 1 Liter	105,0 mg
Stickstoffgehalt der Nährlösung vor dem Versuche pro 1 Liter . . .	4,7 „
Stickstoffgewinn	100,3 mg

B.

Nährlösung mit Konzentration 0,0000025 Atomgewicht Selen.

Gesamtstickstoffgehalt pro 1 Liter	94,0 mg
Stickstoffgehalt der Nährlösung vor dem Versuche pro 1 Liter . . .	4,7 „
Stickstoffgewinn	89,3 mg

C.

Nährlösung mit Konzentration 0,000005 Atomgewicht Selen.

Gesamtstickstoffgehalt pro 1 Liter	92,0 mg
Stickstoffgehalt der Nährlösung vor dem Versuche pro 1 Liter . . .	4,7 „
Stickstoffgewinn	87,3 mg

D.

Nährlösung mit Konzentration 0,0000075 Atomgewicht Selen.

Gesamtstickstoffgehalt pro 1 Liter	86,0 mg
Stickstoffgehalt der Nährlösung vor dem Versuche pro 1 Liter . . .	4,7 „
Stickstoffgewinn	81,3 mg

E.

Nährlösung mit Konzentration 0,00001 Atomgewicht Selen.

Gesamtstickstoffgehalt pro 1 Liter	69,0 mg
Stickstoffgehalt der Nährlösung vor dem Versuche pro 1 Liter . . .	4,7 „
Stickstoffgewinn	64,3 mg

Die Bildung neuer lebender Bakterienmasse bei Azotobacter chroococcum wurde durch die Einwirkung des Selens in Form von Natriumselenit bei einer Konzentration von 0,000005 Atomgewicht in einem bedeutenden Maße herabgesetzt. Diese Depression in der Assimilation des elementaren Stickstoffes und in der Bildung neuer lebender Masse kommt bei höheren Konzentrationen und zwar 0,0000075, weiters namentlich bei 0,00001 Atomgewicht noch mehr zum Ausdruck.

Wenn wir über die Flüssigkeit radioaktive Luft und zwar mit einer Aktivität 41,7 ME., d. h. $16\,721 \cdot 10^{-12} = 0{,}0000167$ mg Ra getrieben haben, ist der Stickstoffgewinn auf 100 mg pro 1 Liter Nährlösung gestiegen. Bei höheren Konzentrationen und zwar 0,0000025 Atomgewicht Selens konnte man einen schwachen Rückgang in der Intensität der Assimilation des elementaren Stickstoffes wahrnehmen und erst bei der Steigerung der Konzentration auf 0,00001 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenit wurde die Energie der Assimilation des elementaren Stickstoffes etwas herabgesetzt.

Aus den beobachteten Vorgängen läßt sich schließen, daß die Radioaktivität die giftige Wirkung des Selens in einem gewissen Maße aufhebt, was natürlich bis jetzt ein unbekanntes Phänomen darstellt. Diese Tatsache stellt eine ähnliche Erscheinung vor, wie ich sie schon in meinen früheren Arbeiten über die antagonistischen Wirkungen der Ionen besprochen habe.

Es ist sicher, daß bei den Bakterien ein plötzliches, schwaches Aufflammen der Stickstoffbindung durch die Radioaktivität hervorgerufen wird, wenn die physiologischen Leistungen für ihr aufkeimendes Leben durch das Selen gehemmt werden. Diese Erscheinungen kommen nicht nur bei den Bakterien, sondern auch, wie wir in späteren Kapiteln lesen werden, namentlich bei höheren Pflanzen und zwar bei Gegenwart des Lichtes zum vollen Ausdruck.

II. Über den Einfluß des Selenions auf die Keimung der Samen bei An- und Abwesenheit der Radiumemanation.

Die Methodik der Versuche wurde in der Weise arrangiert, daß das Selenion in Form von Seleniten und Selenaten angewendet wurde.

Wir benützten folgende Konzentrationen: 0,000001, 0,000005, 0,000007, 0,000009, 0,00001, 0,00005, 0,0001 und 0,0005 Atomgewicht Selens in Gramm als Natriumselenit, welche Mengen in 1000 ccm Wasser gelöst waren.

Bei den Versuchen mit Natriumselenat haben wir nachstehende Konzentrationen angewendet: 0,000001, 0,000005, 0,000007, 0,000009, 0,00006, 0,0005, 0,001 und 0,005 Atomgewicht Selens in Gramm. Das Natriumselenat war in 1000 ccm gelöst, und mit diesen Lösungen haben wir die Samen sowie das Keimbeet befeuchtet.

Die Keimversuche wurden in 60 Liter fassenden Glasglocken bei 18—20° ausgeführt. Damit die Konzentration der Lösungen sich möglichst wenig durch

das Verdunsten ändert, wurden die geräumigen Petrischalen, in denen die Keimversuche angestellt worden sind, mit einem Glasdeckel versehen.

Die Versuche wurden mit Hordeum distichum, Triticum vulgare, Secale cereale, Avena sativa, Polygonum fagopyrum und Vicia faba vorgenommen.

Versuche mit Selenion in Form von Natriumselenit.

Bei den Kontrollversuchen haben nach 110 Stunden gekeimt: Hordeum distichum 98%, Secale cereale 99%, Triticum vulgare 97%, Avena sativa 98%, Vicia faba 91%, Polygonum fagopyrum 90%. Bei Anwendung der Konzentration von 0,000001 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenit haben nach 110 Stunden folgende Mengen der Samen gekeimt: Hordeum distichum 89, Secale cereale 86, Triticum vulgare 84, Avena sativa 88, Vicia faba 79, Polygonum fagopyrum 78%. Bei Anwendung der Konzentration von 0,000005 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenit haben nach 110 Stunden gekeimt: Hordeum distichum 74, Secale cereale 75, Triticum vulgare 71, Avena sativa 78, Vicia faba 74, Polygonum fagopyrum 73%. Bei Anwendung der Konzentration von 0,000007 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenit keimten nach 110 Stunden folgende Mengen: Hordeum distichum 64, Triticum vulgare 58, Secale cereale 55, Avena sativa 52, Vicia faba 52, Polygonum fagopyrum 54%. Bei Anwendung der Konzentration von 0,000009 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenit haben nach 110 Stunden gekeimt: Hordeum distichum 59, Triticum vulgare 56, Secale cereale 55, Avena sativa 49, Vicia faba 48, Polygonum fagopyrum 56%. Bei Anwendung der Konzentration von 0,00001 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenit keimten nach 110 Stunden nachstehende Mengen: Hordeum distichum 40, Triticum vulgare 47, Secale cereale 42, Avena sativa 48, Vicia faba 48, Polygonum fagopyrum 36%. Bei Anwendung der Konzentration von 0,00005 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenit haben nach 110 Stunden nachstehende Mengen gekeimt: Hordeum distichum 28, Triticum vulgare 39, Secale cereale 39, Avena sativa 36, Vicia faba 32, Polygonum fagopyrum 30%. Bei der Konzentration 0,0001 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenit keimten nach 110 Stunden nachstehende Mengen: Hordeum distichum 29, Triticum vulgare 36, Secala cereale 33, Avena sativa 34, Vicia faba 35, Polygonum fagopyrum 30%. Bei Anwendung der Konzentration von 0,0005 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenit keimten nach 110 Stunden folgende Mengen von Samen: Hordeum distichum 31, Triticum vulgare 32, Secale cereale 34, Avena sativa 33, Vicia faba 32, Polygonum fagopyrum 26%.

Versuche mit Selenion in Form von Natriumselenat.

Bei Anwendung der Konzentration von 0,000001 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenat haben nach 110 Stunden folgende Mengen von Samen gekeimt: Hordeum distichum 99%, Triticum vulgare 100%, Secale cereale 99%, Avena sativa 100%, Vicia faba 93%, Polygonum fagopyrum 95%. Die Konzentration von 0,000005 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenat zeigte folgende Resultate in bezug auf die Keimung: Hordeum distichum 98, Triticum vulgare 100, Secale cereale 97, Avena sativa 97, Vicia faba 91, Polygonum fagopyrum 92%. Die Anwendung der Konzentration von 0,000007 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenat brachte nachstehende Resultate zutage: Hordeum distichum 90, Triticum vulgare 88, Secale cereale 91, Avena sativa 88, Vicia faba 93, Polygonum fagopyrum 94%. Bei Anwendung der Konzentration von 0,000009 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenat erzielten wir nach 110 Stunden nachstehende Zahlen: Hordeum distichum 82, Triticum vulgare 80, Secale cereale 88, Avena sativa 84, Vicia faba 83, Polygonum fagopyrum 88%. Bei Anwendung der Kon-

zentration von 0,00006 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenat haben nach 110 Stunden folgende Mengen gekeimt: Hordeum distichum 73, Triticum vulgare 70, Secale cereale 77, Avena sativa 78, Vicia faba 71, Polygonum fagopyrum 78%. Bei Anwendung der Konzentration von 0,0005 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenat erzielten wir nach 110 Stunden folgende Daten, Hordeum distichum 62, Triticum vulgare 60, Secale cereale 66, Avena sativa 60, Vicia faba 63, Polygonum fagopyrum 67%. Bei Anwendung der Konzentration von 0,001 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenat keimten nach 110 Stunden nachstehende Mengen der Samen: Hordeum distichum 43, Triticum vulgare 40, Secale cereale 47, Vicia faba 42, Avena sativa 49, Polygonum fagopyrum 46%. Bei Anwendung der Konzentration von 0,005 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenat zeigten sich nachstehende Resultate nach 110 Stunden in der Keimung: Hordeum distichum 37, Triticum vulgare 35, Secale cereale 49, Avena sativa 48, Vicia faba 46, Polygonum fagopyrum 44%.

Wenn wir die Resultate unserer Untersuchungen mit Natriumselenit überblicken, sehen wir, daß bereits die Konzentration 0,000001 Atomgewicht Selen toxische Wirkungen hervorzurufen imstande ist. Diese Toxizität steigt bei den Konzentrationen 0,000005, 0,000007, 0,000009 und 0,00001 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenit, so daß bereits bei der letztgenannten Konzentration die Keimfähigkeit geringer ist. Bei der Konzentration 0,00005 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenit ist die Keimfähigkeit bei Hodeum distichum und bei Polygonum fagopyrum besonders klein. Bei der Konzentration von 0,0001 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenit wird die Keimfähigkeit aller untersuchten Pflanzen stark beeinträchtigt. Die Konzentration von 0,0005 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenit hat bereits die zahlreichen Embryonen abgetötet, aus welchem Grunde wir die Steigerung der Konzentrationen aufgegeben haben.

Nun gehen wir zu den Resultaten, welche wir mit Natriumselenat erzielt haben, über. Die Konzentration von 0,000001 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenat wirkte auf den ganzen Keimprozeß und die Keimungsenergie, welch letztere sich in intensiverer Weise als bei den Kontrollversuchen kundgab, sehr günstig. Auch die Konzentration von 0,000005 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenat zeigte sich unschädlich, und erst die Anwendung von 0,000007 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenat hat eine kleine Depression in der Keimfähigkeit und Keimungsenergie hervorgerufen. Die Depression der Keimfähigkeit und Keimungsenergie ist bei Anwendung von 0,000009 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenat um etwas gestiegen. Die Konzentration von 0,00006 Atomgewicht Selen hat die Keimfähigkeit und Keimungsenergie der Samen noch mehr gehemmt, welche toxische Wirkung besonders bei der Anwendung von 0,0005 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenat in prägnanter Weise zum Vorschein kam.

Im allgemeinen ist hier zu bemerken, daß das Selen in Form von

Seleniten in bedeutend heftigerer Weise als in Form von Selenaten toxische Wirkungen hervorruft. Wir begegnen also derselben Erscheinung, welche wir bei der Wirkung von Sulfiten und Sulfaten kennengelernt haben.

Das Selenation, in ganz geringen Mengen angewendet, verursacht sogar eine stimulierende Wirkung nicht nur bei dem Keimprozeß, sondern auch bei der Entwicklung der Keimlinge.

Verfolgen wir nun die Wirkung des Selenions auf den Keimungsprozeß bei Gegenwart der Radioaktivität. Wir haben bereits über den Einfluß der Radioaktivität auf den Keimungsprozeß der Samen, und zwar mit natürlicher und künstlicher Radioaktivität, exakte Versuche vorgenommen und gefunden, daß die natürliche sowie auch die künstliche Radioaktivität, deren Emanation durch das Wasser absorbiert wird, einen äußerst günstigen Einfluß auf den ganzen Keimungsverlauf ausübt[1]).

Unsere Keimungsversuche wurden wieder bei Gegenwart von Licht bei einer Temperatur von 23—25° vorgenommen.

Sie wurden in der Weise angestellt, daß 30 ME. in 12 Stunden auf 100 g Samen einwirkten. Das Gewicht der Samen war auf Trockensubstanz berechnet. Der ganze Vorgang spielte sich in 144 Stunden ab, während welcher Zeit ca. 360 ME. $= 144\,360 \cdot 10^{-12} = 0{,}000144$ mg Ra auf 100 g Trockensubstanz der Samen ihre Wirkung ausübten.

In reinem destillierten Wasser haben nach 72 Stunden gekeimt: Hordeum distichum 36%, Secale cereale 37%, Triticum vulgare 35%, Avena sativa 36%, Vicia faba 69%, Polygonum fagopyrum 42%. In reinem destillierten Wasser wurden nach 144 Stunden nachstehende Resultate bei der Keimung beobachtet: Hordeum distichum 99%, Secale cereale 99%, Triticum vulgare 98%, Avena sativa 98%, Vicia faba 95%, Polygonum fagopyrum 96%. Durch den Einfluß der Radioaktivität haben nachstehende Mengen der Samen nach 72 Stunden gekeimt: Hordeum distichum 97%, Triticum vulgare 70%, Secale cereale 82%, Avena sativa 83%, Vicia faba 99%, Polygonum fagopyrum 98%.

Man sieht hier deutlich, daß der Keimungsprozeß durch die Radioaktivität beschleunigt wird, und zwar in einem bedeutenden Maße im Vergleich zu dem Kontrollversuche, bei welchem bloß reines Wasser angewendet wurde. Es ist zu betonen, daß bei jedem Versuche immer das gleiche reine destillierte Wasser benutzt wurde.

Bei unseren Versuchen mit Azotobakter konnten wir wahrnehmen, daß die Toxizität des Selenions in Form von Natriumselenit durch die Einwirkung der Radiumemanation gemildert wird. Es ist gewiß von Belang zu erfahren, wie sich die Wirkung der Radiumemanation auf den Keimungsprozeß der Samen bei Gegenwart des diffusen Lichtes gestaltet, wenn solche Quantitäten Selens in Form von Natriumselenit zur Anwendung kommen, welche schon eine Depression auf die Keim-

---

[1]) Ich verweise hier auf *J. Stoklasa*, Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences **155**, Nr. 22. 1912. — Derselbe, Strahlentherapie **4**, H. 1. 1914.

fähigkeit und die Keimungsenergie verursachten. Um dies zu konstatieren, haben wir jene Konzentration angewendet, bei welcher bereits ein deutlicher Rückgang in der Keimfähigkeit der Samen eintritt, und zwar 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit. Diese Konzentration brachte ohne Anwendung der Radiumemanation nachstehende Mengen der Samen nach 110 Stunden zur Keimung:

Hordeum distichum . .	28%	Avena sativa	36%
Triticum vulgare . . .	39 „	Vicia faba	32 „
Secale cereale.	39 „	Polygonum fagopyrum	30 „

Nachdem wir jeden Tag radioaktives Wasser mit 30 ME. zugesetzt haben, haben folgende Mengen der Samen nach 110 Stunden gekeimt:

Hordeum distichum . .	85%	Avena sativa	68%
Triticum vulgare . . .	72 „	Vicia faba	79 „
Secale cereale.	75 „	Polygonum fagopyrum.	80 „

Nach 144 Stunden keimten in demselben Falle:

Hordeum distichum . .	89%	Avena sativa	92%
Triticum vulgare . . .	90 „	Vicia faba	90 „
Secale cereale.	92 „	Polygonum fagopyrum.	93 „

Wir setzten diesen Versuch fort und wendeten die Konzentration 0,0001 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit an, wozu wir jeden Tag Wasser mit 30 ME. Radium zugesetzt haben. Es keimten nach 110 Stunden:

Ohne Anwendung der Radioaktivität:

Hordeum distichum . .	29%	Avena sativa	34%
Triticum vulgare . . .	36 „	Vicia faba	35 „
Secale cereale.	33 „	Polygonum fagopyrum.	30 „

Bei der Einwirkung der Radiumemanation:

Hordeum distichum . .	83%	Avena sativa	71%
Triticum vulgare . . .	74 „	Vicia faba	78 „
Secale cereale.	72 „	Polygonum fagopyrum.	82 „

In demselben Falle jedoch nach 144 Stunden haben bei der Einwirkung der Radiumemanation gekeimt:

Hordeum distichum . .	90%	Avena sativa	93%
Triticum vulgare . . .	92 „	Vicia faba	88 „
Secale cereale.	88 „	Polygonum fagopyrum.	90 „

Bei unserem dritten Versuche haben wir auch die Konzentration 0,0005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit angewendet, wo noch ein deutlicherer Rückgang der Keimfähigkeit zu konstatieren ist. Nach 110 Stunden ohne Anwendung der Radioaktivität keimten:

Hordeum distichum . .	31%	Avena sativa	33%
Triticum vulgare . . .	32 „	Vicia faba	32 „
Secale cereale.	34 „	Polygonum fagopyrum.	26 „

Durch den Einfluß der Radioaktivität, und zwar 30 ME. pro Tag, keimten nach 110 Stunden:

Hordeum distichum . .	72%	Avena sativa	65%
Triticum vulgare . . .	70 „	Vicia faba	74 „
Secale cereale	68 „	Polygonum fagopyrum.	73 „

Aus allen diesen Versuchen geht hervor, daß die Radioaktivität die Giftwirkung des Selens paralysiert. Es kann angenommen werden, daß die Emanation des Radiums die Selenite in Selenate oxydiert, wodurch die Toxizität aufgehoben wird. Wir haben aber bei anderen Versuchen gefunden, daß die Gegenwart verhältnismäßig größerer Quantitäten von Natriumselenaten die schädliche Wirkung auf den ganzen Keimungsverlauf ebenfalls fast vollständig aufgehoben hat, wie nachstehende Resultate zeigen.

Durch die Anwendung der Konzentration 0,001 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenat keimten nach 110 Stunden:

Hordeum distichum . .	43%	Avena sativa	49%
Triticum vulgare . . .	48 „	Vicia faba	42 „
Secale cereale	47 „	Polygonum fagopyrum.	46 „

Bei Anwendung derselben Konzentration jedoch in Gegenwart der Radioaktivität des Wassers, und zwar 30 ME. pro Tag, ist die Keimfähigkeit der Samen nach 110 Stunden gestiegen:

Bei Hordeum distichum .	auf 88%	Avena sativa . .	auf 80%
Triticum vulgare . .	„ 86 „	Vicia faba	„ 90 „
Secale cereale	„ 78 „	Polyg. fagopyrum.	„ 86 „

Bei Gegenwart der Radioaktivität des Wassers, und zwar 30 ME. pro Tag, haben nachstehende Mengen der Samen nach 144 Stunden gekeimt:

Hordeum distichum . .	92%	Avena sativa	93%
Triticum vulgare . . .	90 „	Vicia faba	94 „
Secale cereale	94 „	Polygonum fagopyrum.	95 „

Bei allen diesen Versuchen wurde die Keimfähigkeit sowie die Keimungsenergie der Samen durch die Radioaktivität gefördert und die toxischen Wirkungen des Selens auf das Protoplasma der Zellen wurden verhindert. Diese merkwürdige Erscheinung, welche wir bei der Einwirkung der Radioaktivität wahrnehmen konnten, ist gewiß von einer großen Bedeutung, und ich werde noch Gelegenheit haben, dieses Phänomen näher zu verfolgen.

Wir verfolgten die Entwicklung nachstehender Keimlinge:

1. Deren Keimprozeß normal verlaufen ist;

2. wurden Versuchskeimlinge gewogen, welche aus der Nährlösung nur mit Selen in Form von Natriumselenit stammten;

3. kamen diejenigen Keimlinge in Betracht, deren Keimfähigkeit und Keimungsenergie bei Gegenwart von Selen durch die Radioaktivität des Wassers gehoben wurde.

Die Pflanzen entwickelten sich *im diffusen Lichte bei einer Temperatur von 18—21°.*

Wir konnten deutliche Unterschiede konstatieren, indem wir nach 20 Tagen nachstehende Mengen an Trockensubstanz bei den 3 Gruppen der Pflanzen vorfanden.

I. Hordeum distichum.

Das Trockensubstanzgewicht von 20 Keimlingen der Kontrollversuche betrug nach 15 Tagen Entwicklungsdauer 0,758 g.

Das Gewicht der 20 Keimlinge, bei welchen die Konzentration 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit angewendet wurde, betrug nach 15 Tagen in der Trockensubstanz berechnet 0,386 g.

20 Keimlinge aus der Nährlösung von 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit zeigten nach Einwirkung der Radioaktivität das Trockensubstanzgewicht 0,898 g.

II. Triticum vulgare.

Das Trockensubstanzgewicht von 20 Keimlingen der Kontrollversuche betrug nach 15 Tagen Vegetationsdauer 0,428 g.

Das Gewicht der 20 Keimlinge, bei welchen die Konzentration 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit angewendet wurde, betrug nach 15 Tagen in der Trockensubstanz berechnet 0,253 g.

20 Keimlinge aus der Nährlösung von 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit zeigten nach Einwirkung der Radioaktivität das Trockensubstanzgewicht 0,514 g.

III. Secale cereale.

Das Trockensubstanzgewicht von 20 Keimlingen der Kontrollversuche betrug nach 15 Tagen Entwicklungsdauer 0,514 g.

Das Gewicht der 20 Keimlinge, bei welchen die Konzentration 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit angewendet wurde, betrug nach 15 Tagen in der Trockensubstanz berechnet 0,205 g.

20 Keimlinge aus der Nährlösung von 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumseleniten zeigten nach Einwirkung der Radioaktivität das Trockensubstanzgewicht 0,632 g.

IV. Avena sativa.

Das Trockensubstanzgewicht von 20 Keimlingen der Kontrollversuche betrug nach 15 Tagen Entwicklungsdauer 0,427 g.

Das Gewicht der 20 Keimlinge, bei welchen die Konzentration 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit angewendet wurde, betrug nach 15 Tagen in der Trockensubstanz berechnet 0,284 g.

20 Keimlinge aus der Nährlösung von 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumseleniten zeigten nach Einwirkung der Radioaktivität das Trockensubstanzgewicht 0,419 g.

Wenn wir die sämtlichen Trockensubstanzgewichte der 20 Keimlinge mit 15tägiger Vegetationsdauer vergleichen, sehen wir, daß das Gewicht der lebenden Masse bei allen 4 Versuchspflanzen durch die Einwirkung der Konzentration 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit eine Depression in der Entwicklung erfahren hat. Jedoch bei jenen Keimlingen aus der Nährlösung, in welcher neben

Selen auch die Radioaktivität enthalten war, ist das Gewicht der lebenden Pflanzenmasse noch gestiegen. Eine Ausnahme machte hier nur der Hafer, bei dessen Keimlingen wir infolge des Einflusses der Radioaktivität das ursprüngliche Gewicht der Kontrollpflanzen feststellen konnten.

Alle diese Versuche wurden unter Einwirkung des Tageslichtes durchgeführt. Die Keimpflanzen aller Versuchspflanzen haben durch die Einwirkung des Selens ungemein gelitten. Im Nährmedium mit der Radioaktivität jedoch waren die Pflanzen prächtig gediehen. Ein frappanter Unterschied in der Entwicklung der Pflanzen zeigte uns die äußerst vorteilhafte Wirkung der Radiumemanation.

Interessante Resultate ergab die Wiederholung derselben Versuche, jedoch in einem dunklen Raume, also bei Abwesenheit des Sonnenlichtes. Hier hat sich die günstige Einwirkung der Radioaktivität nicht im selben Maße geltend gemacht und die toxischen Wirkungen des Selens wurden nicht vollständig aufgehoben. Die Pflanzen, welche sich in einem selenhaltigen Nährmedium unter Einwirkung der Radiumemanation entwickelt hatten, besaßen nicht das üppige Aussehen jener Pflanzen, welche sich unter der Radiation der Sonne entwickelt haben.

Versuche bei Abwesenheit des Sonnenlichtes.

I. Hordeum distichum.

Das Trockensubstanzgewicht von 20 Keimlingen der Kontrollversuche betrug nach 15 Tagen Entwicklungsdauer 0,603 g.

Das Gewicht der 20 Keimlinge, bei welchen die Konzentration 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit angewendet wurde, betrug nach 15 Tagen in der Trockensubstanz berechnet 0,325 g.

20 Keimlinge aus der Nährlösung von 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit zeigten nach Einwirkung der Radioaktivität das Trockensubstanzgewicht 0,409 g.

II. Triticum vulgare.

Das Trockensubstanzgewicht von 20 Keimlingen der Kontrollversuche betrug nach 15 Tagen Vegetationsdauer 0,411 g.

Das Gewicht der 20 Keimlinge, bei welchen die Konzentration 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit angewendet wurde, betrug nach 15 Tagen in der Trockensubstanz berechnet 0,300 g.

20 Keimlinge aus der Nährlösung von 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit zeigten nach Einwirkung der Radioaktivität das Trockensubstanzgewicht 0,342 g.

III. Secale cereale.

Das Trockensubstanzgewicht von 20 Keimlingen der Kontrollversuche betrug nach 15 Tagen Entwicklungsdauer 0,462 g.

Das Gewicht der 20 Keimlinge, bei welchen die Konzentration 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit angewendet wurde, betrug nach 15 Tagen 0,195 g, in der Trockensubstanz berechnet.

20 Keimlinge aus der Nährlösung von 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit zeigten nach Einwirkung der Radioaktivität das Trockensubstanzgewicht 0,208 g.

IV. Avena sativa.

Das Trockensubstanzgewicht von 20 Keimlingen der Kontrollversuche betrug nach 15 Tagen Vegetationsdauer 0,405 g.

Das Gewicht der 20 Keimlinge, bei welchen die Konzentration 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit angewendet wurde, betrug nach 15 Tagen 0,215 g in der Trockensubstanz berechnet.

20 Keimlinge aus der Nährlösung von 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit zeigten nach Einwirkung der Radioaktivität das Trockensubstanzgewicht 0,277 g.

Rutherford nimmt an, daß das Wesen der Radioaktivität im Zerfall des Atoms des radioaktiven Elementes gelegen sei. Er unterscheidet nachstehende Charakteristik der Strahlen:

α-Strahlen, gebildet aus positiv geladenen rasch fliegenden materiellen Partikeln der Größe des Heliumatomes, die wenig ablenkbar sind im magnetischen bez. elektrischen Felde, und zwar im Sinne der „Kanalstrahlen".

β-Strahlen, gebildet aus elektrisch negativen Korpuskeln (Elektronen), die relativ stark ablenkbar sind, je härter (je weniger absorbierbar), destoweniger, die in voller Analogie stehen zu den „Kathodenstrahlen".

γ-Strahlen, die sich als unablenkbar erwiesen und keine Ladungen tragen.

Es ist gelungen, außer der Emanation eine ganze Reihe von Zerfallsprodukten des Radiums zu entdecken. Hierzu gehört die sogenannte induzierte Radioaktivität. Diese haben wir auch tatsächlich in den Organismen jener Pflanzen, welche in radioaktiver Luft und radioaktivem Boden bei Gegenwart von Licht sich entwickelten, nachweisen können.

In meinen Arbeiten habe ich deutlich hervorgehoben, daß das Licht im Kausalnexus mit der Radiowirkung steht. Wir konnten stets beobachten, daß die toxische Wirkung der Radiumemanation in der chlorophyllhaltigen Zelle auftrat, wenn das Licht keinen Zutritt hatte, und unsere Versuche bestätigen diese früheren Beobachtungen in vollem Maße. Wir können hier einen deutlichen Rückgang in der Bildung der lebenden Pflanzenmasse, im Gegensatze zu den vorangegangenen Versuchen in Anwesenheit des Tageslichtes, bei allen 4 Versuchspflanzen feststellen. Die Toxizität des Selens wurde paralysiert, jedoch nicht in dem Maße, wie bei der bei Licht entwickelten chlorophyllhaltigen Pflanze. Es ist analog, daß die Radiumemanation die toxische Wirkung des Selens bei den heterotrophen Pflanzen, also bei der chlorophylllosen Zelle nicht gänzlich aufgehoben hat. Der Radioaktivität ist bei der Photosynthese der grünen chlorophyllhaltigen Zelle eine wichtige Rolle zugewiesen.

III. Über den Einfluß des Selens auf den Bau- und Betriebsstoffwechsel der Pflanzen bei An- und Abwesenheit der Radioaktivität.

Um dieses Problem zu lösen, wendeten wir die Wasserkulturmethode an. Unsere Versuche wurden derart angeordnet, daß sich die Pflanzen unter den günstigsten Vegetationsfaktoren entwickeln konnten, wobei wir die Einwirkung des Selens in Form von Seleniten und Selenaten auf das Protoplasma sowie auf das Chlorophyll bei Ab- und Anwesenheit der Radioaktivität beobachteten.

Unsere Methodik der Versuche war folgende: Die ausgesuchten Samen verschiedener Kulturpflanzen, welche annähernd das gleiche Gewicht besaßen, gaben wir in einen Keimapparat, welcher mit von sterilem Brunnenwasser angefeuchtetem, sterilem Sande gefüllt war. Sobald die Keimlinge der angewendeten Pflanzen, abgesehen von der Hauptwurzel und der Plumula, noch einige, mehrere Zentimeter lange Nebenwuzeln ausgebildet hatten, nahmen wir sie vorsichtig aus dem Keimapparat heraus, spülten sie mit sterilisiertem, destilliertem Wasser sehr sorgfältig ab und brachten sie mit Hilfe der Wasserkulturmethode zur weiteren Entwicklung. Die Pflanzen züchteten wir in einer Nährlösung, welche ab und zu erneuert wurde. In 1000 ccm destillierten Wassers der Nährlösung waren enthalten: 1 g Natriumnitrat, 0,25 g Kaliumchlorid, 0,02 g Natriumchlorid, 0,25 g Magnesiumsulfat, 0,50 g Dikaliumphosphat, 0,25 g Calciumsulfat und 0,10 g Ferrophosphat.

Das Selen wurde wieder in Form von Natriumseleniten und Natriumselenaten angewendet, und zwar in nachstehenden Konzentrationen: 0,000005, 0,00001, 0,00005, 0,0001, 0,0005, 0,001, 0,005 und 0,01 Atomgewicht Selens in Gramm pro 1000 ccm Nährlösung.

Es ist zu bemerken, daß die Nährlösung bei den Wasserkulturversuchen alle **14—16** *Tage erneuert wurde, um die jedesmal reduzierten Selenite und Selenate zu entfernen und die Exaktheit der Versuche sicherzustellen.*

Zu unseren Versuchen haben wir nachstehende Pflanzen herangezogen: Hordeum distichum, Zea mais, Polygonum fagopyrum, Vicia faba, Soja hispida und Lupinus angustifolius. Um die Unterschiede in der Wirkung der Natriumselenite und Natriumselenate besser zu illustrieren, führe ich die Resultate beider Versuche gleichzeitig an. Die angeführten Zahlen drücken das Trockensubstanzgewicht von je 10 Pflanzenexemplaren aus.

1. Versuche mit Hordeum distichum.

Die Einwirkung des Selens dauerte 99 Tage und wir erzielten die nachstehende Trockensubstanzproduktion.

Kontrollversuche (Nährlösung ohne Selen 52,36 g).

Angewendete Konzentration des Selens Atomgewicht in g	Selen in Form von Seleniten g	Selen in Form von Selenaten g
0,000005	48,64	55,74
0,00001	40,08	53,18
0,00005	38,75	50,94
0,0001	30,16	42,85
0,0005	22,09	36,34
0,001	10,46	17,18
0,005	6,30	9,93
0,01	1,67	3,72

2. Versuche mit Zea mais.

Wirkungsdauer des Selens: 112 Tage.
Kontrollversuche (Nährlösung ohne Selen 109,86 g).

Angewendete Konzentration des Selens Atomgewicht in g	Selen in Form von Seleniten g	Selen in Form von Selenaten g
0,000005	115,4	138,9
0,00001	102,7	130,5
0,00005	83,2	106,1
0,0001	54,7	73,6
0.0005	29,3	66,2
0,001	8,2	34,7
0,005	2,6	12,8
0,01	abgestorben	6,7

3. Versuche mit Polygonum fagopyrum.

Wirkungsdauer des Selens: 84 Tage.
Kontrollversuche (Nährlösung ohne Selen 4,18 g).

Angewendete Konzentration des Selens Atomgewicht in g	Selen in Form von Seleniten g	Selen in Form von Selenaten g
0,000005	4,96	5,88
0,00001	3.67	4,63
0,00005	2,07	2,98
0,0001	0,83	1,63
0,0005	0,36	0.89
0,001	0,18	0,39
0,005	0,11	0,17
0,01	abgestorben	0,20

4. Versuche mit Vicia faba.

Wirkungsdauer des Selens: 103 Tage.
Kontrollversuche (Nährlösung ohne Selen 51,06 g).

Angewendete Konzentration des Selens Atomgewicht in g	Selen in Form von Seleniten g	Selen in Form von Selenaten g
0.000005	46,39	52,74
0,00001	42.68	50.19
0,00005	30.95	48,27
0,0001	31,03	39,75
0,0005	22,17	38,02
0.001	10.34	16,42
0,005	5,15	10,68
0,01	abgestorben	3,21

5. Versuche mit Soja hispida.

Wirkungsdauer des Selens: 98 Tage.
Kontrollversuche (Nährlösung ohne Selen 8,96 g).

Angewendete Konzentration des Selens Automgewicht in g	Selen in Form von Seleniten g	Selen in Form von Selenaten g
0,000005	7,94	9,58
0,00001	7,02	9,02
0,00005	6,05	8,16
0,0001	5,16	6,33
0,0005	4,15	4,75
0,001	3,27	4,36
0,005	2,40	2,08
0,01	1,04	1,94

6. Versuche mit Lupinus angustifolius.

Wirkungsdauer des Selens: 78 Tage.
Kontrollversuche (Nährlösung ohne Selen 22,79 g).

Angewendete Konzentration des Selens Atomgewicht in g	Selen in Form von Seleniten g	Selen in Form von Selenaten g
0,000005	21,86	25,37
0,00001	19,18	24,02
0,00005	10,57	19,95
0,0001	8,64	15,48
0,0005	5,32	8,13
0,001	2,11	3,88
0,005	1,07	2,57
0,01	abgestorben	2,69

Wenn man an der Hand der Resultate den Einfluß des Selens auf den Bau- und Betriebsstoffwechsel der Pflanzen näher betrachtet, sieht man auf den ersten Blick, daß dieses Element in Form von Selenaten nicht dieselbe Wirkung wie in Form von Seleniten hervorruft. Wir haben sogar konstatiert, daß der Ertrag an Pflanzenmasse durch geringere Quantitäten Selens und zwar **0,000005** Atomgewicht und manchmal auch 0,00001 Atomgewicht Selens in Form von Selenaten gesteigert wurde. Man kann das dadurch erklären, daß eine stimulierende Wirkung bei Hordeum distichum, Polygonum fagopyrum, Vicia faba, Soja hispida, Lupinus angustifolius, namentlich aber bei Zea mais erzielt wurde.

Wenn wir die Toxizität des Selens verfolgen, sehen wir eine stufenweise Abnahme in der Bildung neuer lebender Pflanzenmasse bei der Steigerung der Konzentration des Selenions, wobei stets das Selenition das Selenation in seiner Toxizität übertrifft. In der Konzentration von 0,01 Atomgewicht Selens in Gramm in Form von Natriumselenit in 1000 ccm Nährlösung wurde das Leben allmählich sistiert, so daß bei Anwendung der genannten Konzentration Zea mais, Polygonum fagopyrum, Vicia faba und Lupinus angustifolius nach einer gewissen Zeit zum Absterben gebracht wurden.

Die Vegetationsversuche bei Anwesenheit der Radioaktivität.

Bereits seit dem Jahre 1906 andauernde Versuche in unserer Versuchsstation haben bewiesen, daß die Radioaktivität einen großen Einfluß auf den gesamten Bau- und Betriebsstoffwechsel besitzt[1]).

Ich führe hier nur einige Beobachtungen, und zwar die Resultate an, welche wir mit Gerste (Hordeum distichum), Buchweizen (Polygonum fagopyrum), Lupine (Lupinus angustifolius) und Pferdebohne (Vicia faba) erzielt haben. Unsere Versuche wurden mit natürlicher und künstlicher Radioaktivität ausgeführt, wobei wir wahrnehmen konnten, daß bei der Anwendung schwacher Radioaktivität der gesamte Stoffwechsel der Pflanzen viel rapider vor sich geht als bei den Kontrollversuchen, und die Radioaktivität einen günstigen Einfluß auf die Produktion der lebenden Pflanzenmasse ausübt. Die Versuche wurden im Glashause zuerst in Glaszylindern und dann in großen Vegetationsgefäßen angestellt. Es ist zu bemerken, daß die Glaszylinder mit den Pflanzen, welche in der die Radiumemanation enthaltenden Nährlösung gezogen wurden, abgesondert aufgestellt waren, damit die Radiumemanation auf die Kontrollpflanzen sich nicht ausbreitet. Dieselbe Maßregel gilt von den Vegetationsgefäßen.

Versuche mit Gerste (*Hordeum distichum*).

Diese Versuche wurden ebenfalls in großen Vegetationsgefäßen mit 24 kg Lehmboden pro Topf ausgeführt. 10 Vegetationsgefäße dienten wieder zur Kontrolle und 10 Vegetationsgefäße wurden mit radiumemanationhaltigem Wasser begossen. Pro 1 Vegetationsgefäß wurden folgende Nährstoffe angewendet:

0,4 g N in Form von Natriumnitrat, 0,8 g P_2O_5 in Form von Monocalciumphosphat und 1,2 g K_2O in Form von Kaliumchlorid. Die Vegetationszeit dauerte 148 Tage und es wurden pro 10 Vegetationsgefäße 165 200 ME. benützt, so daß auf ein Vegetationsgefäß, in welchem sich 8 Pflanzen befanden, 16 520 ME. entfielen. Auf eine Pflanze kamen 2065 ME. $= 827\,664 \cdot 10^{-12} = 0{,}000827$ mg Ra, pro Tag ca. 14 ME. $= 5614 \cdot 10^{-12} = 0{,}0000056$ mg Ra. Der Ertrag an Pflanzenmasse in Trockensubstanz ausgedrückt war folgender:

	Frucht g	Stroh g	Ganze Pflanzen g
Mit radioaktivem Wasser .	152,2	320	**472,4**
Ohne radioaktives Wasser	104,3	241	345,3
Differenz für Radium + .	48,1	79	127,1
Differenz in % + ...	46,1 %	32,7 %	36,8 %

Nun schreiten wir zu dem Versuche mit Lupinus angustifolius, der in derselben Weise ausgeführt wurde wie der frühere. Die Versuchszeit dauerte hier 135 Tage.

[1]) *J. Stoklasa*, Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences **155**, Nr. 22. 1912; **156**, Nr. 2. 1913. — Derselbe, *S. Šebor* et *V. Zdobnický*, Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences **156**, Nr. 8. 1913. — Derselbe, Chemiker-Zeit. 1912, Nr. 142, S. 1382; Strahlentherapie **4**, H. 1. 1914; Chemiker-Zeit. 1914, Nr. 79, S. 841; diese Zeitschr. **1**. 1920; **2**. 1920. — Derselbe, Die Bedeutung der Radioaktivität des Kaliums bei der Photosynthese. Diese Zeitschr. **3**. 1920.

10 Vegetationsgefäßen, in denen sich 48 Pflanzen befanden, wurden 96 000 ME., also einer Pflanze 2000 ME. = 800 000 · 10^{-12} = 0,0008 mg Ra, also pro eine Pflanze und Tag 14 ME. = 5614 · 10^{-12} = 0,0000056 mg Ra zugeführt, während 10 Vegetationsgefäße zur Kontrolle dienten.

Der Ertrag an Pflanzenmasse in Trockensubstanz ausgedrückt war nachstehender:

	Samen g	Stroh g	Ganze Pflanzen g
Mit radioaktivem Wasser .	224,91	451,25	**676,16**
Ohne radioaktives Wasser	136,58	284,16	420,75
Differenz für Radium + .	88,33	167,09	255,41
Differenz in %+	64,6%	58,8%	60,7%

Ebenso günstige Resultate erzielten wir bei unserem Versuche mit Pferdebohne (Vicia faba), der genau so angestellt wurde wie der erste Versuch. Diese Versuche wurden in 16 Vegetationsgefäßen ausgeführt. Eine Gruppe, bestehend aus 8 Vegetationsgefäßen, diente zur Kontrolle, die andere Gruppe wurde mit radiumemanationhaltigem Wasser begossen. Als Nährstoffe wurden 5 g Calciumsulfat und 5 g Kaliumphosphat angewendet. Die Vegetationszeit dauerte 140 Tage und es wurden 74 160 ME. pro 8 Vegetationsgefäße, also pro 1 Vegetationsgefäß 9270 ME. benutzt. In jedem Vegetationsgefäß befanden sich 5 Pflanzen, also pro Pflanze 1854 ME. = 743 454 · 10^{-12} = 0,00074 mg Ra, und pro Tag ca. 13 ME. = 5213 · 10^{-12} = 0,0000052 mg Ra. Der Ertrag auf 10 Vegetationsgefäße umgerechnet, war folgender:

	Samen g	Stroh g	Ganze Pflanzen g
Mit radioaktivem Wasser .	223	351	**574**
Ohne radioaktives Wasser	167	305	472
Differenz für Radium + .	56	46	**- 102**
Differenz in %+	33,53%	15,08%	**21,61%**

Ferner haben wir noch andere Versuche in der Art ausgeführt, daß wir verschiedene Kulturpflanzen nach 65 Vegetationstagen in Vegetationsgefäßen im Glashaus zur Entwicklung brachten und mit einem Wasser von verschiedener Aktivität begossen. Wir konnten konstatieren, daß in dem Vegetationsgefäße, in welchem sich 6—8 kg Erde befanden, und das mit Radiumwasser von 600 ME. pro Pflanze täglich begossen wurde, sich schon nach 50—80 Vegetationstagen ein schädlicher Einfluß einstellte. Namentlich die Blätter der Zuckerrübe, der Kartoffel, der Weinrebe und des Tabaks waren angegriffen, das Chlorophyll war abgebaut und die Blätter hatten eine rotbraune Farbe angenommen. Auch bei anderen Pflanzen konnte man nach 60—100 Tagen der Behandlung mit Radiumwasser eine markant toxische Wirkung beobachten. Es waren dies die Gramineen, Leguminosen und Cruciferen, bei denen sich die Blätter rotbraun gefärbt hatten, das Chlorophyll in dem Chlorenchym vollständig zersetzt wurde und man eine Plasmolyse beobachten konnte. Daraus ersieht man, daß es hauptsächlich darauf ankommt, die richtige

Dosierung der Radiumemanation zu wählen, denn nur durch eine schwache Aktivität lassen sich überall mit Ausnahme von gewissen Kalipflanzen gute Resultate erzielen.

Alle die von uns angestellten Versuche zeigen, daß eine Radiumemanation in schwacher Aktivität und bei richtiger Dosierung die Karyokinese in der Zelle und überhaupt die Mechanik des ganzen Bau- und Betriebsstoffwechsels äußerst günstig beeinflußt. Auf Grund unserer Beobachtungen können wir erklären, daß die Radiumemanation nicht immer in gleichem Maße auf die Entwicklung und Stoffwechselprozesse der einzelnen Pflanzen einwirkt; es ist das ein ganz individuelles Verhalten aller Pflanzengattungen. Gewiß von großer physiologischer Bedeutung ist es, zu studieren, welche Dosis der Emanation bzw. welches Optimum sich für den Organismus der Kulturpflanzen am besten eignet. Bestimmte Daten lassen sich freilich derzeit nicht anführen, da unsere Erfahrungen darin noch zu gering sind. Wir konnten ja die Beobachtung machen, daß bei gewissen Vegetationsfaktoren einige Pflanzen auf eine höhere Dosis, andere wieder auf eine schwächere Dosierung reagierten. Aus unseren ganzen Studien ist ersichtlich, daß die Zuckerrübe eine eigentümliche Stellung unter allen Kulturpflanzen gegen die Radiumwirkung einnimmt.

Um zu konstatieren, ob die Radioaktivität des Wassers wieder die giftige Wirkung des Selenitions paralysiert und derart günstig einwirkt, wie es bei der Verfolgung der Keimungsenergie und des ganzen Keimverlaufes der Fall war, haben wir nachstehende Methodik der Versuche eingehalten. In jedem Vegetationsgefäß waren 3500 ccm Nährlösung, zu welcher wir soviel radioaktives Wasser zusetzten, daß dieselbe stets 14 ME. $= 5614 \cdot 10^{-12} = 0{,}0000056$ mg Ra pro Pflanze und Tag enthielt.

Zu unseren Versuchen haben wir wieder Gerste, Welschkorn, Buchweizen, Lupine und Pferdebohne herangezogen, wobei wir eine Konzentration von Selenion, welche bereits einen deutlichen Rückgang in der Pflanzenproduktion bewirkt hatte, und zwar 0,0005 Atomgewicht Selen in Gramm als Natriumselenit pro 1000 ccm Nährlösung anwendeten. Das sonstige Arrangement blieb dasselbe wie bei den vorerwähnten Experimenten, auch unter den gleichen Vegetationsfaktoren, so daß wir eine vollständige Parallele geschaffen haben.

1. Hordeum distichum.

Nach 99 Tagen Vegetationsdauer betrug das Gewicht von 10 Pflanzenexemplaren aus der Nährlösung 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit 22,09 g in der Trockensubstanz.

Bei Anwendung derselben Nährlösung, jedoch mit 14 ME. $= 5614 \cdot 10^{-12} = 0{,}0000056$ mg Ra pro 1 Pflanze und Tag, erhöhte sich das Gewicht von 10 Pflanzenexemplaren in der Trockensubstanz auf 50,03 g.

2. Zea mais.

Nach 112 Tagen Vegetationsdauer betrug das Gewicht von 10 Pflanzenexemplaren aus der Nährlösung 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit 66,2 g in der Trockensubstanz.

Bei Anwendung derselben Nährlösung, jedoch mit 14 ME. = $5614 \cdot 10^{-12}$ = 0,0000056 mg Ra pro 1 Pflanze und Tag, erhöhte sich das Gewicht von 10 Pflanzenexemplaren in der Trockensubstanz auf 114,6 g.

3. Polygonum fagopyrum.

Nach 84 Tagen Vegetationsdauer betrug das Gewicht von 10 Pflanzenexemplaren aus der Nährlösung 0,00005 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit 0,36 g in der Trockensubstanz.

Bei Anwendung derselben Nährlösung, jedoch mit 14 ME. = $5614 \cdot 10^{-12}$ = 0,0000056 mg Ra pro 1 Pflanze und Tag, erhöhte sich das Gewicht von 10 Pflanzenexemplaren in der Trockensubstanz auf 5,06 g.

4. Lupinus angustifolius.

Nach 99 Tagen Vegetationsdauer betrug das Gewicht von 10 Pflanzenexemplaren aus der Nährlösung 0,00005 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenit 5,32 in der Trockensubstanz.

Bei Anwendung derselben Nährlösung, jedoch mit 14 ME. = $5614 \cdot 10^{-12}$ = 0,0000056 mg Ra pro 1 Pflanze und Tag, erhöhte sich das Gewicht von 10 Pflanzenexemplaren in der Trockensubstanz auf 21,39 g.

5. Vicia faba.

Nach 99 Tagen Vegetationsdauer betrug das Trockensubstanzgewicht von 10 Pflanzenexemplaren aus der Nährlösung 0,00005 Atomgewicht Selen in Form von Natriumselenit 22,17 g.

Bei Anwendung derselben Nährlösung jedoch mit 14 ME. = $5614 \cdot 10^{-12}$ = 0,0000056 mg Ra pro 1 Pflanze und Tag erhöhte sich das Gewicht von 10 Pflanzenexemplaren in der Trockensubstanz auf 52,90 g.

Die Vegetationsversuche bei Anwesenheit der Radioaktivität sind äußerst lehrreich. Wir haben von neuem konstatiert, daß die Toxizität des Selenitions bei Anwendung 14 ME. = $5614 \cdot 10^{-12}$ = 0,0000056 mg Ra pro Tag und Pflanze fast vollständig paralysiert wurde.

Die einzelnen Resultate, miteinander verglichen, zeigen nachstehende Gewichte pro 10 Pflanzenexemplare. Bei Hordeum distichum sehen wir 52,36 g Trockensubstanzgewicht der Kontrollversuche, welche auf 38,75 g durch die Einwirkung des Selenitions gesunken sind, jedoch durch die Mitwirkung der Radiumemanation auf 50,03 gesteigert wurden. Ebenso wechselt bei Zea mais das Trockensubstanzgewicht von 109,86 g der Kontrollversuche zu 66,2 g der 10 Pflanzenexemplare aus der Nährlösung mit Selenition und auf 114,6 g bei der Mitwirkung der Radiumemanation. Polygonum fagopyrum weist das Trockensubstanzgewicht 4,18 bei den Kontrollversuchen pro 10 Pflanzen auf, welches Gewicht bei Anwesenheit des Selenitions auf 2,07 g fällt und durch die gleichzeitige Anwendung der Radiumemanation 5,06 g erreicht.

Das Trockensubstanzgewicht von 10 Pflanzen zeigt bei Lupinus angustifolius 22,79 g der Kontrollversuche, bei den Pflanzen aus der Nährlösung mit Selenition beträgt es 10,57 g und bei jenen Pflanzen aus der erwähnten Nährlösung jedoch mit Radiumemanation 21,39 g.

In ähnlichem Verhältnisse stehen die verschiedenen Trockensubstanzgewichte der 10 Pflanzenexemplare bei Vicia faba und zwar bei den Kontrollversuchen 51,06 g in der Nährlösung mit Selenition 30,95 g und bei der Einwirkung der Radiumemanation 52,90 g.

Ich habe bereits in dieser Arbeit hervorgehoben, daß die Radiumemanation ein erhöhtes Oxydationsvermögen besitzt, weshalb man auch annehmen könnte, daß die Radiumemanation die Oxydation des Selenitions und seine Umwandlung in das Selenation bewirkt. Die Wirkung dieser beiden Ionen auf das Protoplasma der Zellen hat sich bei einzelnen Pflanzen in ihrer Intensität ganz verschieden erwiesen, und die Trockensubstanzgewichte dieser Pflanzen, miteinander verglichen, zeigen bedeutende Differenzen. Diesem Umstande entsprechend wurde das Trockensubstanzgewicht von 10 Pflanzenexemplaren bei Hordeum distichum, welches nach der Einwirkung des Selenations 36,34 g betragen hatte, durch die Radiumemanation auf 50,03 g erhöht. Bei Zea mais betrug das Gewicht der 10 Pflanzen aus der Nährlösung mit Selenation 66,2 g in der Trockensubstanz, welche durch die Radiumemanation auf 114,6 g gesteigert wurden. Den auffallendsten Unterschied konnten wir bei Polygonum fagopyrum konstatieren, bei welcher Pflanze das Trockensubstanzgewicht mit 0,89 g in der Nährlösung mit Selenation bestimmt wurde und das durch die Radiumemanation 5,06 g erreichte. Bei Lupinus angustifolius weisen die Pflanzen aus der Nährlösung mit Selenation das Trockensubstanzgewicht von 8,13 g und jenes nach der Einwirkung der Radiumemanation 21,39 g auf. Auch Vicia faba verhält sich analog. Das Trockensubstanzgewicht der Pflanzen aus der Nährlösung mit Selenation beträgt hier 38,02 g, welche sich nach der Einwirkung der Radiumemanation auf 52,90 g erhöhen.

Diese bedeutenden Differenzen im Gewichte der gebildeten neuen Pflanzenmasse lassen uns zu der Ansicht kommen, daß die Oxydationsprozesse allein, d. i. die Umwandlung der Selenite in Selenate, die fortdauernde Giftigkeit nicht beseitigen, und es existieren jedenfalls andere Phänomene, welche auf die Bildung neuer lebender Pflanzenmasse trotz der Anwesenheit des Selens einen derart günstigen Einfluß besitzen und den gesamten Bau- und Betriebsstoffwechsel der chlorophylllosen und chlorophyllhaltigen Zelle fördern.

IV. Über die Wirkung des Selenions auf die Vegetation bei An- und Abwesenheit der Radioaktivität in Boden.

Die Methodik der Versuche.

Unsere Versuche haben wir in einem geräumigen Glashause durchgeführt, in welchem auf (Eisenbahn-) Schienen bewegliche kleine Rollwagen vorhanden sind, welche die Vegetationsgefäße tragen. Bei günstigem Wetter wurden diese lowryartigen Wagen mit den Vegetationsgefäßen in einen unmittelbar an das Glashaus

sich anschließenden Raum, der zum Zwecke des Schutzes vor allerlei Schädigungen allseitig von Wänden aus dichtem Drahtgeflecht abgeschlossen ist, herausgefahren.

Die erwähnten Vegetationsgefäße sind unglasierte zylindrische Behälter aus Ton. In der Nähe des Bodens ist jedes dieser zylindrischen Gefäße mit einer seitlichen Öffnung versehen, die einen einmal gebohrten Stopfen trägt, und in diesem steckt eine im rechten Winkel gebogene Glasröhre. Die Vegetationsgefäße wurden mit Ackererde, und zwar mit je 9 kg Lehmboden angefüllt. Zur Düngung verwendeten wir folgende Nährstöffe pro Vegetationsgefäß: 2 g Monocalciumphosphat, 2 g Ammoniumsulfat und 2 g Kaliumchlorid. Der Boden hatte während der ganzen Vegetationsperiode 20—25% Wasser enthalten, und als Versuchspflanze wählten wir Gerste (Hordeum distichum). Das Selenion wurde wieder in Form von Seleniten und Selenaten zur Anwendung gebracht. Da wir die Erfahrung gemacht hatten, daß sehr schwache Dosierungen von Selen keine Reaktionen hervorzurufen imstande sind, wählten wir nachstehende Konzentrationen: 0,0001, 0,001, 0,002 und 0,003 Atomgewicht Selens in Gramm pro Gefäß, und zwar inForm von Natriumselenit und Natriumselenat. Diese Salze, in Wasser aufgelöst, wurden 14 Tage vor der Aussaat dem Boden einverleibt. Die Quantitäten Selens in Form von Seleniten und Selenaten wurden den Vegetationsgefäßen nicht auf einmal zugegeben, um die Reduktionen dieser Salze im Boden zu verhüten. Die Dosierungen sind in den ersten 42 Vegetationstagen erfolgt. Zu jedem Versuche nahmen wir 5—7 Vegetationsgefäße; die nachstehenden Werte beziehen sich auf die Trockensubstanz von je 10 Vegetationsgefäßen.

Die Kontrollvegetationsgefäße (ohne Anwendung von Selen) lieferten folgenden Ertrag:

An Frucht	135,6 g
„ Stroh usw.	228,2 „

Bei der Einwirkung des Selens wurde geerntet:

	Frucht g	Stroh usw. g
Konzentration 0,0001.		
Wirkung des Selenitions	137,5	225,8
Wirkung des Selenations	141,9	235,0
Konzentration 0,001.		
Beim Selenition	48,9	204,0
Beim Selenation	56,8	222,7
Konzentration 0,002.		
Bei der Wirkung des Selenitions .	20,5	192,0
Bei der Wirkung des Selenations .	25,3	228,4
Konzentration 0,003.		
Bei der Wirkung des Selenitions .	9,15	110,8
Bei der Wirkung des Selenations .	13,7	221,9

Nun gehen wir zu den Versuchen über die Einwirkung der Radioaktivität über.

Der Boden der Vegetationsgefäße wurde mit radioaktivem Wasser begossen und es entfielen auf je 1 Gefäß, in welchem sich 8 Pflanzen befanden, 16 520 ME., so daß auf eine Pflanze 2065 ME. $= 827\,664 \cdot 10^{-12} = 0{,}000827$ mg Ra, pro Tag ca. 14 ME. $= 5614 \cdot 10^{-12} = 0{,}0000056$ mg Ra, kamen. Der Ertrag an Pflanzenmasse, in Trockensubstanz ausgedrückt, war pro 10 Vegetationsgefäße folgender:

Vergleichende Versuche mit der Konzentration 0,001 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit und Natriumselenat.

	Frucht g	Stroh usw. g
Kontrollversuche ohne Anwendung des Selenions (der Boden der Gefäße wurde bloß mit radioaktivem Wasser begossen) ergaben	159,8	271,3
Bei Vorhandensein Selens im Boden und bei Anwendung der Konzentration 0,001 Atomgewicht Selens in Form von Seleniten und Selenaten. Der Boden der Vegetationsgefäße wurde mit radioaktivem Wasser begossen.		
Bei Gegenwart von Selenition	96,4	185,2
Bei Gegenwart von Selenation	142,5	257,7

Die vorstehenden Resultate der Versuche lassen uns die Hemmung der toxischen Wirkung des Selenions durch die Radioaktivität deutlich erkennen. Während wir bei derselben Konzentration des Selens ohne Anwendung der Radioaktivität beim Selenition 48,9 g an Frucht sowie 214 g an Stroh, und beim Selenation 56,8 g Frucht, 222,7 g Stroh geerntet hatten, manifestiert hier der Ertrag bei der Anwendung des Selenitions mit 96,4 g Frucht, 185,2 g Stroh und beim Selenation 142,5 g Frucht, 257,7 g Stroh.

V. Versuche im Glas-Emanatorium.

Die Methodik dieser Experimente wurde in der Weise angeordnet, daß wir das Selendioxyd auf die Pflanze direkt, und zwar bei An- und Abwesenheit der Radiumemanation einwirken ließen.

Das fein zerriebene, graue krystallinische Selen wurde abgewogen und auf einer Platinschale im Emanatorium bei Gegenwart der gewöhnlichen oder radioaktiven Luft verbrannt, wobei nach *Berzelius* auch etwas Selenoxyd (SeO) entsteht. Es ist zu bemerken, daß bei diesem Verbrennen auch ganz wenig Selen in Form von feinem, rötlichem Pulver sich abscheidet; infolgedessen ist dieser Versuch nicht als ganz exakt zu betrachten. Zu unseren Experimenten haben wir verschiedene Quantitäten von Selen abgewogen, so daß nachstehende Konzentrationen von Selendioxyd im Emanatorium entstanden sind:

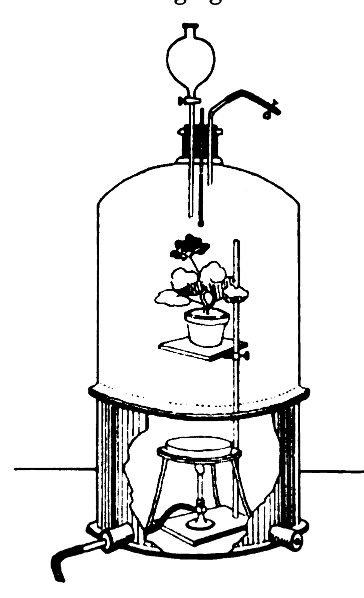
Die Konzentration des Selendioxydes in Form von Selen ausgedrückt war: im ersten Falle 0,000002 und im zweiten Falle 0,00002 Atomgewicht Selens in Gramm in Form von Selendioxyd. Hierbei ist zu bemerken, daß die Platinschale nach der Verbrennung des Selens stets abgewogen wurde und im Falle, daß gewisse Reste von Selen übrigblieben, hat man diese Menge abgezogen. Jene Versuche, bei denen die Konzentration nicht eingehalten wurde, schalteten wir aus.

Für die Kontrollversuche haben wir ein zweites Emanatorium verwendet. Wie *in der Abbildung* S. 632 zu sehen ist, befand sich die Platinschale mit Selen unterhalb der Vegetation. Im Boden des Emanatoriums waren 2 Tuben angebracht, von welchen die eine zum Zuführen und die andere zum Anzünden des vollständig gereinigten Leuchtgases bestimmt waren. Jedes Emanatorium hatte den Inhalt von 66 Liter. Zu den Experimenten haben wir folgende Pflanzen herangezogen:

Hordeum distichum, Triticum vulgare, Vicia faba, Phaseolus vulgaris, Pisum sativum, Pelargonium inquinans, Primula sinensis und Cyclamen europeum.

Bei allen unseren Beobachtungen konnten wir feststellen, daß die verwendeten Pflanzen bei stärkerer Dosierung, und zwar 0,00002 Atomgewicht Selens schon binnen 2—5 Stunden stark angegriffen wurden, während bei der Konzentration 0,000002 Atomgewicht Selens der Abtötungsprozeß erst nach 30 evtl. 56 Stunden eingetreten war.

Die durch das Selendioxyd angegriffenen Blätter der Pflanzen waren zuerst weißgelb, welche Farbe dann allmählich in dunkelgelb bis braunschwarz überging. Noch früher zeigten die Blüten eine Veränderung. Die ursprüngliche Blütenfarbe ist verschwunden, und die Blüten zeigten eine braunschwarze Färbung.



Das Selendioxyd sowie das Selenoxyd sind als heftige Gifte anzusehen und ihre Wirkung äußert sich viel stärker als jene des Schwefeldioxyds.

Unsere Experimente dehnten wir aus, indem wir die Pflanzen, welche mit radioaktivem Wasser begossen waren, weiter im Emanatorium sich entwickeln ließen, und zwar bei Anwendung des Uranpecherzes mit einem Gehalt an Radioaktivität $161 \cdot 10^{-9}$ g Ra in 1 g. Im Emanatorium waren vorhanden: 13,8 ME., was entspricht $5533{,}8 \cdot 10^{-12} = 0{,}0000055$ mg Ra.

Bei den Resultaten der Versuche, welche wir mit Radiumemanation vorgenommen haben, konnten wir keinen derartigen Effekt in der Hemmung der Toxizität wie bei unseren Wasserkulturversuchen sowie bei der radioaktiven Ackererde in den Vegetationsgefäßen wahrnehmen. Die Ursache hierfür liegt in dem Umstande, daß die Toxizität des Selendioxyds zu rasch *und* akut wirkt, als daß die Radiumemanation ihre günstige Wirkung zur Geltung bringen könnte, wie nachstehende Versuche dokumentieren. Diese wurden bei Gegenwart und Abwesenheit des Tageslichtes, um auch dessen Einfluß auf die Giftigkeit des Selendioxyds zu erforschen, vorgenommen.

Betrachten wir zuerst die Versuche mit der schwachen Dosierung, d. i. 0,000002 Atomgewicht Selens in Gramm als Selendioxyd evtl. Selenoxyd. Bei einer Temperatur von 21—28° C sind die jungen Keimpflanzen von Hordeum distichum, Triticum vulgare, Vicia faba, Phaseolus vulgaris und Pisum sativum nach 30—48 Stunden hier vollständig abgestorben. Bei den Versuchen mit den in Blüte stehenden Primula

sinensis, Pelargonium inquinans und Cyclamen europaeum zeigten diese eine gewisse Widerstandsfähigkeit, denn sie gingen erst nach 52—76 Stunden zugrunde. Es war bei diesen Versuchen auffallend, daß zuerst die Blüten und dann erst die Blätter angegriffen wurden. Durch die Einwirkung des Selendioxyds nahmen die Blüten zuerst eine rötlichgraue Färbung an und dann welkten sie ab. Sie wurden bereits nach 2—4 Stunden durch die Seleneinwirkung angegriffen. Bei den Blättern machte sich die Einwirkung des Selendioxyds in der Weise geltend, daß sie eine gelbrote Farbe, welche dann in eine schwarzbraune überging, annahmen.

Bei der Anwendung der Konzentration 0,00002 Atomgewicht Selens in Gramm als Selendioxyd evtl. Selenoxyd wurden sämtliche Versuchspflanzen bei einer Temperatur von 24—29° C nach 2—5 Stunden stark angegriffen und sind allmählich eingegangen.

Wenn wir die Radioaktivität im Emanationsraum mit 13,8 ME., was $5533{,}8 \cdot 10^{-12} = 0{,}0000055$ mg Ra entspricht, einwirken ließen, konnten wir bloß bei der schwachen Dosierung eine gewisse Widerstandsfähigkeit der Versuchspflanzen beobachten, indem diese nicht so stark angegriffen wurden wie jene ohne Einwirkung der Radiumemanation; der Abtötungsprozeß trat aber nach 60—78 Stunden doch ein. Nachdem die Radioaktivität hier eine zu geringe Wirkung sehen ließ, um daraus irgendwelche Schlüsse ableiten zu können, haben wir die weiteren Experimente in dieser Weise nicht mehr fortgesetzt.

Es ist sicher festgestellt, daß das Selen auf das Protoplasma der Pflanzenzelle sehr giftig einwirkt, und zwar zeigte es sich in Gasform als Selendioxyd viel wirksamer als in Form von Seleniten. Wir konnten hier auch einen ungeheuren Unterschied in der Wirkung des Selendioxydes auf das Protoplasma sowie das Chlorophyll der Pflanzenzelle konstatieren, im Vergleich zu jener des Schwefeldioxydes, das sich als viel schwächer zeigt. Gegen beide Gase ungemein empfindlich jedoch zeigen sich die Blütenorgane.

VI. Vergleichende Versuche zwischen Schwefel- und Selendioxyd.

Unsere Keimversuche, welche wir mit Selen in Form von Seleniten und Selenaten durchgeführt haben, ließen uns bereits erkennen, daß der Keimprozeß durch die Gegenwart des Selens namentlich in seiner Form als Selenit in hohem Maße beeinträchtigt wird. Wir führten nun weitere Versuche durch, um den Unterschied in der Wirkung des Schwefeldioxyds und Selendioxyds kennenzulernen. Unsere Versuche hatten den Zweck, zu eruieren, wie sich die einzelnen Dosierungen der schwefligen Säure zu dem Keimungsprozeß der Pflanzensamen verhalten.

Zu diesem Zwecke nahmen wir 10 g Samen von verschiedenartigen Pflanzen und ließen entweder 0,01 g oder 0,001 g schwefliger Säure einwirken; auf diese Weise entfielen auf 100 g Pflanzensamen 0,1 g oder 0,01 g schwefliger Säure. Diese Versuche wurden in großen, hermetisch geschlossenen Glaszylindern vorgenommen. Die Samen wurden auf eine Schichte Filtrierpapier gelegt und hierzu stets ein gleiches Quantum Wasser (20 ccm) zugesetzt. In einer Serie der Zylinder befand sich bloß reines destilliertes Wasser, in der anderen wies das Wasser eine verschiedene Konzentration von schwefliger Säure auf. In allen Keimungsapparaten befand sich aber die gleiche Menge Wasser.

Die Versuche wurden mit nachstehenden Samenpflanzen ausgeführt: Gerste (Hordeum distichum), Weizen (Triticum vulgare), Mais (Zea mais), Klee (Trifolium pratense), Erbse (Pisum sativum), Wicke (Vicia faba), Gelbe Lupine (Lupinus luteus) und Senf (Sinapis alba).

Während die Konzentration von 0,01 g schwefliger Säure auf die Keimfähigkeit und Keimungsenergie der 100 g Samen bei einer Temperatur von 20° C verhältnismäßig nur sehr schwachen Einfluß ausgeübt hat, wirkte die Konzentration von 0,1 g schwefliger Säure in demselben Falle bereits auf das Erwachen des Embryos stark hemmend. Hier konnten wir von neuem den ungeheueren Unterschied der toxischen Wirkung bei Schwefeldioxyd und Selendioxyd, welches letztere sich viel intensiver kundgibt, feststellen.

Wie die Versuche uns lehrten, wirkt der Schwefel in Form von Schwefeldioxyd erst beim Atomgewicht 0,001 in Gramm, wobei toxische Wirkungen auf den Embryo des Samens zur Geltung kommen und der ganze Keimungsvorgang zerstört wird.

Durch die Wirkungen des Schwefeldioxydes auf die Vegetation entstehen akute, chronische und unsichtbare Schäden. Die akuten Schäden werden durch die Atmosphäre, die einen anormalen hohen Gehalt an Schwefeldioxyd besitzt, hervorgerufen. Es genügen hierzu minimal 0,01—0,2 Vol.-% Schwefeldioxyd in der Luft. Chronische Schäden zeigen sich bei der Vegetation, und zwar in Feld, Wald und Garten, wenn sich kleinere Mengen als 0,01 Vol.-% Schwefeldioxyd in der atmosphärischen Luft befinden.

Sorauer und *Ramann* verstehen in ihrer Arbeit „Sogenannte unsichtbare Rauchbeschädigungen" unter „unsichtbaren" Rauchschäden solche Störungen der Pflanzen, welche nur in der Zuwachsgröße zum Ausdruck kommen, aber mit dem bloßen Auge nicht wahrnehmbar sind.

Wenn die Atmosphäre einen Gehalt von 0,0005 Vol.-% Schwefeldioxyd enthält, kommen nach meinen Beobachtungen bereits die chronischen Schäden zur Wirkung.

Aus allen diesen Angaben geht hervor, daß das Selen auf den Abbauprozeß des Protoplasmas viel heftiger einwirkt als das Schwefeldioxyd.

Wir wollen jetzt die physiologischen Wirkungen der Selenit- und Selenationen auf den Pflanzenorganismus näher beleuchten. Wir konstatierten hier außer einer Verzögerung in der Keimung und im Wachstum einzelner Pflanzenorgane auch eine ausgesprochen giftige Wirkung auf den Embryo, wodurch dieser evtl. zum Absterben gebracht wird. Die Toxizität wird durch die Wärme noch gesteigert. Die komparativen

Versuche ergaben, daß die giftige Wirkung bei niedriger Temperatur nicht so intensiv wie bei einer höheren war, was mit unseren Beobachtungen auch beim Schwefeldioxyd vollständig übereinstimmt[1]).

VII.

Bei der Verfolgung der Einwirkung des Selendioxyds auf das Wurzelsystem können wir beobachten, daß durch das Selenit- und Selenation die schlauchartigen Wurzelhaare, deren Protoplasma ungemein empfindlich ist, angegriffen werden. Auch die Wurzelhaube wird durch das Selenit- sowie Selenation in jenen Konzentrationen, welche die giftige Wirkung ersehen lassen, ungünstig beeinflußt und zwar auch in der Dunkelkammer. Der toxische Einfluß nämlich bleibt nicht derselbe, wenn die Lebensprozesse bei Tageslicht, wo sich die Wirkung nicht so intensiv kundgibt als wenn sie in der Dunkelkammer vor sich gehen[2]).

Ganz anders zeigen sich die Beschädigungen an den Blättern der Pflanzen. Bei den Chlorophyllorganen werden zuerst die Spaltöffnungen durch Einwirkung des gasförmigen Selendioxyds stark angegriffen; sie färben sich rotbraun und in ihrem ausgedehnten System von Intercellularen des Blattinnern finden wir mikroskopisch das ausgeschiedene Selen. Zuerst werden die Schließzellen zerstört, welche sich durch das ausgeschiedene Selen stets orangegelb färben. Die Zellen der chlorophyllfreien Epidermis, und namentlich jene chlorophyllreichen Partien unter dem oberen Teil, werden durch das gasförmige Selendioxyd innerhalb 2—4 Stunden bei stärkeren Konzentrationen ebenfalls angegriffen und das Chlorophyll zerstört. Sein grüner Farbstoff wird in Gelbrot umgewandelt, welches dann in Braun bis Braunschwarz übergeht. Das Palisadengewebe wird unter der Einwirkung der in der Nährlösung vorhandenen Selenite und Selenate langsam angegriffen und das im Palisadengewebe reichlich vorhandene Chlorphyll wird allmählich abgebaut, welche Vorgänge von der Stärke der Konzentrationen abhängig sind.

Durch mikroskopische Beobachtungen des Blattquerschnittes konnten wir konstatieren, daß die Intercellulare (sog. Atemhöhle) stets kleine

---

[1]) In kurzer Zeit erscheint meine ausführliche Arbeit „Über die Beschädigungen der Vegetation durch Rauchgase und Fabriksexhalationen" im Verlage Urban & Schwarzenberg (Berlin u. Wien). In dieser Publikation werden meine ausführlichen Studien über die toxischen Wirkungen des Schwefeldioxyds besprochen.

[2]) Durch die Einwirkungen des Selenit- sowie Selenations in ihren niederen Konzentrationen wird das Wurzelsystem schwach lichtbraun gefärbt und bei fortgesetzter Wirkung scheidet sich das elementare Selen aus. Dieses rotgefärbte Selen kann man unter dem Mikroskope deutlich wahrnehmen. Bei Anwendung stärkerer Konzentrationen wird das kolloidale Selen auf der Oberfläche des Wurzelsystems teilweise durch die Reduktionsprozesse ausgeschieden.

Partikelchen des durch Reduktion ausgeschiedenen Selens in schöner roter Farbe aufweist. Dieses kommt natürlich nur bei schwachen Dosierungen vor, denn in stärkeren Konzentrationen wird das Protoplasma abgebaut, wobei es eine braune Farbe annimmt. Das elementare Selen ist in der Intercellulare nachweisbar.

Von allen Organen der Samenpflanzen (Phanerogamen) wird die Blüte am heftigsten durch das Selen in Form von Seleniten und Selenaten beeinflußt. Namentlich das Selendioxyd in Gasform wirkt ungemein stark, so daß Blüten bereits bei der Konzentration 0,000002 Atomgewicht in 12—20 Stunden und bei 0,00002 binnen 2 Stunden zum Welken, später zum gänzlichen Absterben gebracht werden. Die farbigen Blütenblätter entfärben sich, vertrocknen am Stengel oder fallen braunschwarz gefärbt ab. Namentlich sind es die Staubfäden sowie die Stempel, welche schon bei ganz schwachen Konzentrationen vergiftet werden. Wie wir durch unsere Versuche nachgewiesen haben, genügt die minimalste Konzentration des Selens, d. i. 0,0001 Atomgewicht, um die Staubfäden sowie die Stempel in ihren Funktionen zu stören, infolgedessen der Befruchtungsvorgang sich nicht normal gestaltet. Das Schwefeldioxyd wirkt bereits in ganz schwachen Konzentrationen seiner Gasform hingegen viel energischer als das Natrium- und Kaliumsulfit, so daß der geschilderte Zerstörungsvorgang viel rascher abläuft und eine Befruchtung ausgeschlossen bleibt.

Bringt man Pollenkörner in eine 3 proz. Rohrzuckerlösung, so wachsen in einigen Stunden aus ihnen lange, farblose Schläuche, Pollenschläuche hervor, ähnlich wie z. B. aus keimenden Pilzsporen ein Myzel entsteht. Durch die Anwendung der Konzentration 0,0001 Atomgewicht Selens in Form von Selenition wird die Bildung der Pollenschläuche sistiert.

Unsere Experimente über die Intoxikationen des Selenit- sowie Selenations haben uns belehrt, daß die Transpirationsprozesse durch diese Ionen nicht beeinflußt werden. Ihre Wirkung macht sich jedoch auf die Triebe der Laub- und Nadelbäume insofern geltend, daß letztere weniger Wasser aufnehmen wie auch abgeben, als dies der Fall ohne Seleneinwirkung wäre. Diese Störungen verursachen jene Konzentrationen, welche auch sonst imstande sind, Vergiftungserscheinungen hervorzurufen.

In systematischer Verfolgung dieser Intoxikationen haben wir unter dem Mikroskope wahrgenommen, daß eine Plasmolyse bei Anwendung von schwachen Konzentrationen der Selenite und Selenate in der Zelle stattfindet und diese sich mit Steigerung der Konzentrationen von Wasserstoffionen in der Lösung vergrößert. Die toxische Wirkung des Selens in Form von Seleniten und Selenaten, namentlich aber in seiner Gasform als Selendioxyd, äußert sich weiterhin in dem Umstande, daß der Chemismus der photosynthetischen Assimilation beeinträchtigt

wird. Unsere vergleichenden Versuche mit Schwefeldioxyd ergaben ebenfalls positive Resultate in dieser Richtung, und zwar in einer ausgesprochen heftigen Weise, jedoch nicht mit der toxischen Energie wie das Selendioxyd.

Gehen Intoxikationsprozesse in einem Selenite und Selenate enthaltenden Nährmedium der Pflanze, welches aus festem Boden oder Lösung besteht, vor sich, wird das Chlorophyll nur bei starken Konzentrationen in Gegenwart von Sonnenlicht allmählich abgebaut. Nicht uninteressant ist gewiß unsere seit neuester Zeit gemachte Beobachtung, daß dieser Fall sehr rasch und heftig in Abwesenheit des Lichtes eintritt.

Aus allen unseren mikrochemischen Beobachtungen, namentlich aus dem Nachweis des Chlorophyllgrüns mittels der bekannten Hypochlorin- oder Chlorophyllanreaktion von *Pringsheim* oder *Tswett*schen Reaktion mit Wasserstoffsuperoxyd und Ferrocyankalium sowie gesättigter Kalilauge oder der *Tswett*schen Chloroglobinreaktion erhellt, daß in dem Chlorenchym die Chloroplasten durch das Selen in Form von Seleniten und Selenaten heftiger in Abwesenheit des Lichtes angegriffen werden.

Bei jenen Experimenten, wo die Pflanzen sich in den Vegetationsgefäßen allmählich entwickelten und in Anwesenheit des Sonnenlichtes das Selen langsam resorbierten, vermochte erst die Konzentration 0,0001 Atomgewicht Selens in Form von Natriumselenit oder Natriumselenat eine deutliche Wirkung auf die Chlorphyllorgane geltend zu machen. Die Radiation der Sonnenstrahlen bewirkte langsam durch fortschreitende Entwicklung der Pflanzen eine Reduktion des Selens, welches dann in Palisaden- und Schwammgewebe ausgeschieden sichtbar wurde. Ganz andere Lebensprozesse traten bei jenen Pflanzen zutage, welche wir unter selben Bedingungen, jedoch ohne Licht, durch einige Zeit vegetieren ließen.

Interessante Beobachtungen haben wir bei den Intoxikationsversuchen mit den Seleniten und Selenaten während des Winters gemacht, wo die photochemischen Reduktionen nicht so energisch wie im Sommer vor sich gegangen sind. Unsere Versuche mit schwachen und starken Dosierungen haben ergeben, daß sich das Selen im Blattorgan sehr wenig reduziert hat. Das kolloidale Selen konnte man in den Intercellularräumen nur in sehr geringen Quantitäten konstatieren. Diese Reduktionen standen im auffallenden Gegensatz zu jenen, wo die photochemische Reduktion bei der energischen Radiation der Sonne erfolgte.

Diejenigen Ionenkonzentrationen, welche in Gegenwart von Licht das Protoplasma und Chlorophyll abzubauen nicht imstande waren, verursachten in der Dunkelkammer die Störungsprozesse binnen verhältnismäßig kurzer Zeit.

Der autotrophe Stoffwechsel geht mit Hilfe des Chlorophyllfarbstoffes vor sich. Letzterer, welcher sich an bestimmte organische, je nach der Pflanzenart verschiedene plasmatische Gebilde, die Chloro-

plasten, gebunden befindet, unterstützt die grüne Pflanze bei der Ausnützung der Lichtenergie. Ein fundamentaler Unterschied in der Wirkung des Selens und jener *des Schwefels bildet die Tatsache, daß letzteres Element wie überhaupt alle Sulfite bei Gegenwart der Lichtenergie die größten toxischen Wirkungen hervorrufen, wogegen ohne die Radiation der Sonne die Abtötungsprozesse viel langsamer erfolgen. Diese eigentümliche Eigenschaft konnten wir in gerade umgekehrter Weise bei den Selenverbindungen konstatieren.*

Das Chlorophyll befindet sich in der lebenden Pflanzenzelle in kolloidaler Form. Durch den Einfluß der schwefligen Säure wird das Chlorophyll unter Abspaltung von Basen und des Phytols abgebaut, welche schädliche Wirkung durch die Gegenwart des Sonnenlichtes noch bedeutend gesteigert wird. Daß die Schwefligsäureionen von der Pflanzenzelle zurückgehalten werden, ergaben schon unsere früheren Versuche, wo wir unmittelbar nach der Beschädigung in der Lage waren, die schweflige Säure sowohl qualitativ als auch quantitativ mit vollster Bestimmtheit nachweisen zu können. Von allen Organen waren es die Blätter, in welchen die größte Menge schwefliger Säure vorhanden war.

Diese Beobachtung steht im scharfen Gegensatze zu den Resultaten unserer Versuche mit Selen, wo wir in den sich bei Tageslicht entwickelnden Pflanzen niemals wasserlösliche Selenverbindungen vorfanden. Das Selen enthielten hier die Pflanzenorgane in seiner elementaren Form und zwar ausgeschieden durch die Reduktionsprozesse bei Gegenwart des Lichtes. Das Selen wurde in den Pflanzen nach den bekannten Methoden konstatiert, so daß wir mit seiner Anwesenheit sicher rechnen können. Es ist sehr bemerkenswert, daß alle selenhaltigen Pflanzen bei Anwesenheit des Lichtes ganz andere exteriäre Blätter und farbige Blüten zeigen. Bei Gegenwart von Insolation hatten die durch Selenverbindungen in pathologischen Zustand versetzten Pflanzen ihre Blätter durch das ausgeschiedene Selen orangegelb gefärbt, wogegen diejenigen Blätter, auf welche keine Sonnenenergie einwirkte, weißgelb waren, und wir konnten hier das kolloidale Selen nur in ganz geringen Quantitäten nachweisen. Hiermit wurde der Beweis für die chemische Wirkung des Sonnenlichtes erbracht, da in diesem Falle die Reduktionsprozesse der Selenverbindungen in ihrem Verlaufe energisch gefördert und für das Protoplasma und Chlorophyll teilweise unschädlich gemacht wurden.

Das elementare Selen erweist sich physiologisch für das Protoplasma und die Chlorophyllorgane als ungefährlich, während das Selen in Form von Selendioxyd oder Seleniten und Selenaten auf diese Pflanzenorgane stark toxisch wirkt.

Unsere Versuche haben bewiesen, daß sich das Protoplasma und Kinoplasma der Zellen verschiedener Pflanzen zu der toxischen Wirkung der Selendioxydionen nicht gleich verhalten. Es existiert also gegen

den Einfluß der Selendioxydionen eine spezifische Empfindlichkeit des Protoplasmas und Kinoplasmas der einzelnen Pflanzen.

Das Licht als Reagens verursacht in der Pflanzenzelle lichtkatalytische Vorgänge von hoher physiologischer Bedeutung[1]). Es gehört zu den fundamentalsten Tatsachen der Physiologie der Zelle, daß die Assimilationstätigkeit grüner Pflanzen an die Gewährung einer bestimmten, nicht zu geringen Lichtintensität gebunden sei. Es ist ja bekannt, daß die Sauerstoffausscheidung bei der Chlorophylltätigkeit geeignet ist, den schädlichen Einfluß der im Sonnenlichte enthaltenen chemisch wirksamen Strahlen für die Pflanzenzellen zu eliminieren.

Wie unsere Experimente nachweisen, besitzt der ganze Chemismus, welcher durch die Radiation der Sonne in der Zelle hervorgerufen wird, einen großen Einfluß auf die Reduktionsprozesse der Selenverbindungen. Um die Wirkung des Lichtes auf die Reduktionsvorgänge der Selenverbindungen zu studieren, operierten wir mit mehreren Pflanzen und zwar: Azalea, Nicotiana longiflora, Fuchsien und Rosa centifolia. Die Pflanzen wurden in den Vegetationsgefäßen mit einer Nährlösung, in welcher das Selen in Form von Natriumselenit und Natriumselenat in der Konzentration 0,001 Atomgewicht enthalten war, begossen. Die erste Gruppe der Pflanzen entwickelte sich in Anwesenheit des Lichtes, die zweite in der Dunkelkammer und die dritte Gruppe hatte man derart arrangiert, daß die Ästchen, Blätter und evtl. Blüten in einem dunklen Raum geborgen waren, damit das Licht auf diese Pflanzenteile nicht einwirken könnte. Wo das Licht intensiv einwirkte, wurde das Selen in roter kolloidaler Form in den Pflanzengeweben viel stärker zur Ausscheidung gebracht als es bei jenen Pflanzen, bei welchen die Radiation der Sonne nicht miteingewirkt hat, der Fall war.

Von den verschiedenen Pflanzenteilen waren es die Blüten, welche auf das Licht besonders reagiert haben. Bei den in der Dunkelkammer vegetierenden Pflanzen konnte man das ausgeschiedene Selen in geringeren Quantitäten mikroskopisch beobachten, als bei jenen Pflanzen, welche in Anwesenheit des Sonnenlichtes wuchsen, und bei welchen die Blüten infolge des großen Selengehaltes verschiedene Variationen der Färbung angenommen hatten.

Bemerkenswerte Resultate haben unsere Forschungen über die Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf die Vegetation unter Benützung einer Quecksilberquarzlampe geliefert, wobei die Lichtstrahlen durch Rubingläser durchgeleitet wurden[2]). Es hat sich gezeigt, daß namentlich das rote Licht die Ausscheidung des Selens wirksam beeinflußte, und das Selen in Form von Seleniten und Selenaten nicht so

[1]) Vgl. *C. Neuberg*, Beziehungen des Lebens zum Licht. Monogr. Berlin 1913.

[2]) *J. Stoklasa, E. Senft, F. Straňák* und *W. Zdobnický*, Ber. d. Akad. d. Wiss. Wien 1911.

toxisch wie bei gewöhnlichem Tageslicht wirkte. Die ultravioletten Strahlen haben merkwürdigerweise denselben Effekt wie das gewöhnliche Tageslicht gezeigt.

Die Insolation spielt bei der Giftwirkung des Selens auf alle autotrophe Pflanzen eine ungeheure Rolle. Bei Gegenwart von Licht und bei intensiven photosynthetischen Prozessen wirkt das Selen durchaus nicht so toxisch wie bei Abwesenheit des Lichtes.

Die Reduktion der Selenate und Selenite in der Pflanzenzelle ist äußerst lehrreich.

Wie bekannt, erfolgt diese Reduktion durch Bakterien unter Abscheidung von kolloidalem Selen, intracellular. Ich verweise hier auf die Arbeiten von *Klett*[1]) und *Scheurlen*[2]) sowie *Gosio*[3]).

Die Reduktionswirkungen in der Pflanzenzelle überhaupt wurden von vielen Forschern verfolgt. In dem chemischen Mechanismus aller dieser Reduktionen ist es aber angesichts der vielgestaltigen Möglichkeiten bei der Gegenwart so vieler oxydabler organischer Materialien in der Zelle und der Eventualität von Enzymwirkungen nicht leicht eine bestimmte Einsicht zu gewinnen.

Man könnte annehmen, daß der Wasserstoff eine Rolle bei der Reduktion der Selenite und Selenate spielt, oder wenn wir uns nach unseren Erfahrungen beim Studium der Dynamik der intramolekularen Atmung richten, wäre es der Alkohol (*Stoklasa*) oder der Aldehyd (*Neuberg*)[4]), welche die Reduktion erregen. Nach meiner Anschauung sind es reduzierende Enzyme, welche neben der photochemischen Reaktionen die Toxizität herabsetzen.

Schon *Schreiner* und *Sullivan*[5]) haben die reduzierenden Wirkungen in den Phanerogamenwurzeln zu erklären gesucht. In der Tat haben sie gefunden, daß die Selenite und Selenate durch das Wurzelsystem reduziert werden. Ob die Ursache in thermolabilen Stoffen der Wurzelepidermiszellen liegt, oder ob andere Stoffe, wie der Wasserstoff und die hier produzierte Ameisensäure, eine Rolle spielen, wurde nicht näher untersucht.

Die Tatsache, daß viele Lebensvorgänge der lebendigen Zellen von wesentlich chemischer Natur sind, beweist nicht notwendigerweise, daß die durch die Wirkung intracellulärer Enzyme zustande gebracht werden, aber sie lassen es wenigstens annehmen, daß dies der Fall ist. Nur weitere Forschung kann zeigen, inwieweit eine solche Hypothese gerechtfertigt erscheint und wie groß der wirkliche Anteil der chemischen Prozesse im Protoplasma ist; welche Prozesse von der Enzymwirkung und welche von anderen chemischen Faktoren abhängen. Daß enzymatische Reduktionen beim gesamten Kraft- und Stoffwechsel in der Zelle vor sich gehen, wurde von vielen Forschern angedeutet. Nament-

---

1) *A. Klett*, Zeitschr. f. Hyg. **33**, 137. 1900.

2) *Scheurlen*, Zeitschr. f. Hyg. 1900, S. 135.

3) *B. Gosio*, Zeitschr. f. Hyg. **51**, 65. 1905.

4) *C. Neuberg* und Mitarbeiter, diese Zeitschr. 1911—1922.

5) *Schreiner* und *Sullivan*, Bot. Gaz. **51**, 12. 1911. — Vgl. auch *Alvisi* und *Orabona*, Gaz. Chim. Ital. **42** (I), 565. 1912. — *Sullivan*, Biochem. Bull. **3**, 449. 1914. — *W. v. Kühr*, Intern. agr.-techn. Rundsch. **6**, 1126. 1915.

lich sind es *Grüss* und *Pozzi-Escot*[1]), welche für das schwefelreduzierende Enzym den Namen Hydrogenasen, entsprechend dem Ausdrucke Oxydasen, zusammenfassen, da sie ja alle das gemeinsame Merkmal haben, die Anlagerung von Wasserstoff zu katalysieren und nicht immer Sauerstoff entziehen müssen. *Bach*[2]) nannte diese Enzyme Reducasen, *Abelous* und *Aloy* sprechen von Oxyhydrasen.

Die grundlegenden Arbeiten von *Neuberg*[3]) lassen andererseits ersehen, daß die katalytischen Lichtreaktionen, welche bei der photosynthetischen Assimilation eine hervorragende Rolle spielen, sehr in Betracht gezogen werden müssen.

In Anbetracht der photochemischen Reaktion, welche durch das Selen veranlaßt wird, können wir auch leicht die Reaktionen durch das Licht begreifen. *Das Selen geht während des Belichtens in eine Form über, die die Elektrizität gut leitet. Da diese Form aber nur im Lichte existenzfähig ist, so verwandelt sie sich im Dunkeln in die schlechtleitende zurück. Demzufolge verändern sich gewisse Eigenschaften des Selens durch die Anwesenheit des Lichtes. Man ist durch geeignete Relais imstande, intermittierende Belichtungen einer empfindlichen Selenzelle in intermittierende elektrische Ströme umzusetzen und auf größere Entfernungen fortzuleiten. Unter dem Einflusse des Lichtes erleidet die Selenzelle eine Veränderung in dem Sinne, daß sich eine andere Modifikation des Selens, die den elektrischen Strom gut leitet, bildet. Dieser Fakt besitzt für das Studium über die Wirkung des Selens auf den gesamten Bau- und Betriebsstoffwechsel der Pflanze eine eminente Wichtigkeit.*

Wie die Experimente uns lehrten, wurde die Toxizität des Selens bei der Erzeugung der organischen Substanz in der lebenden Zelle bei Anwesenheit des Lichtes durch die Einwirkung der Radiumemanation ungemein herabgesetzt; die physikochemischen Grundlagen des Stoffumsatzes gestalten sich daher bei der Anwesenheit der Radiumemanation ganz anders. Die Aufnahme der Aschenbestandteile, Dynamik der Kohlensäureassimilation gehen durch die Radiumemanation bei Gegenwart von Selen in Form von Seleniten und Selenaten ungestört vor sich, und wir können bei allen unseren Versuchspflanzen wahrnehmen, daß das Selen nicht reduziert wird und das Wachstum ganz normal ist. Einer geringen Abweichung von dieser Regel begegnen wir nur im Anfang des Aufbaues neuer lebender Pflanzenmasse, wo eine reichere Menge des ausgeschiedenen Selens in den Blattorganen anzutreffen ist.

Durch die Einwirkung der Radiumemanation werden die Selenite oxydiert und in Selenate, welche sich bei unseren Experimenten nicht

[1]) *J. Grüss*, Ber. bot. Ges. **26a**, 627. 1908.
[2]) *A. Bach*, Arch. Sci. Nat. Genève (4) **32**, 27. 1911; diese Zeitschr. **31**, 443. 1911.
[3]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **13**, 305. 1908; **27**, 271; **29**, 279. 1910; **61**, 315; **67**, 63. 1914; **71**, 219. 1915.

in dem Maße giftig gezeigt hatten, übergeführt. Man könnte also annehmen, daß lediglich die Radiumemanation die Aufhebung der Toxizität veranlaßt hat, welcher Fall jedoch hier nicht zutrifft, da selbst die Anwendung derjenigen Konzentrationen des Selens, welche auch in Form von Selenaten Vergiftungsprozesse bereits hervorrufen, blieb durch das Vorhandensein der Radiumemanation ohne nachteilige Folgen und der Aufbau der Pflanzenmasse, der ganze Baustoffwechsel, Speicherung und Mobilisierung stickstofffreier sowie stickstoffhaltiger organischer Substanzen gingen in normaler Weise vor sich. Wir fanden merkwürdigerweise, daß in den Spaltöffnungen, in der Epidermis, im Palisadengewebe sowie Schwammparenchym nur geringere Quantitäten des Selens in kolloidaler Form sich ausgeschieden hatten. Der Bau der Wurzeln, Stengel, Blätter sowie der Blüten gestaltete sich durch die Einwirkung der Radiumemanation und in Anwesenheit der Insolation üppig, wie das Trockensubstanzgewicht der geernteten Pflanzenmasse darstellt.

Eine Durchsicht der diesbezüglichen modernen Literatur führt uns zu der Erkenntnis, daß gewisse Beziehungen zwischen den Gammastrahlen und der elektrischen Leitfähigkeit des Selens bestehen.

Himstedt[1]) konstatierte, daß der elektrische Widerstand von Selen sich verringerte durch den Einfluß von Radiumstrahlen in gleicher Weise wie durch den Einfluß des gewöhnlichen Lichtes. Derselbe Forscher bewundert die merkwürdigen Eigenschaften des Selens, vergleicht diese mit jenen des Radiums und meint, daß das Selen alle auf sich gefallenen Strahlen in seine eigene Ausstrahlung verwandelt.

A. M. Mc Mahon[2]) hat gefunden, daß die elektrische Leitfähigkeit eines Selenkrystalls durch Bestrahlung mit Röntgen- oder Gammastrahlen in ähnlicher Weise erhöht wird, wie bei Bestrahlung mit Licht.

Auch die Forschungen von *J. J. Dobbie* und *J. J. Fox*[3]) sowie *A. O. Rankine*[4]), auch *Bianca Nannels*[5]) beweisen, daß es sich um eine arbeitsspeichernde Reaktion handelt, und daß die Leitfähigkeit des Selens durch das Radium beeinflußt wird. Dieser gewisse Zusammenhang in der Wirksamkeit der Radiumemanation und des Selens stellt ein Phänomen dar, welches vom biochemischen Standpunkte aus eine große Aufmerksamkeit verdient; denn durch die Radiumemanation wird das Selen in Form von Seleniten und Selenaten für die lebende Pflanzenzelle unschädlich gemacht.

Durch die Radiumemanation werden die Selenate und Selenite, wie unsere Versuche bewiesen haben, nicht reduziert, aus welchem Grunde die Annahme, daß sich das kolloidale Selen durch diesen Vorgang im Nährmedium ausgeschieden hätte, nicht auf Richtigkeit beruhen

---

1) *Himstedt*, Phys. Zeitschr. **1**, 476. 1900.

2) *A. M. Mc Mahon*, Physical Review (2) **16**, 558—64. 1920.

3) *J. J. Dobbie* und *J. J. Fox*, Proc. of the roy. soc. of London, Serie A **98**. 147—153. 1920.

4) *A. O. Rankine*, Philos. Magazine (6) **39**, 482—488 (Imperial College).

5) *Bianca Nannel*, Il Nuovo Cimento (6) **20**, 185—200. 1920.

kann. Ob etwa die Sekrete des Wurzelsystems bei Gegenwart der Radioaktivität hierbei eine Rolle spielen, können nur weitere Forschungen entscheiden; daß die Phanerogamenwurzeln die Selenite und Selenate reduzieren, haben wir bereits an einer anderen Stelle geschildert. Ob die Ursache in thermolabilen Stoffen der Wurzelepidermiszellen liegt, oder ob anderweitige Stoffe, welche im anaeroben Zustande ausgeschieden werden, eine Rolle spielen, ist noch eine Frage.

Die Radiumemanation vermag in ihrer chemischen Wirkungsweise exo- und endoenergetische Prozesse einzuleiten und zu beschleunigen; die Stärke der biologischen Wirkung ist nun von der absorbierten Strahlenenergie abhängig. Nach den modernen Anschauungen liegt dem Vorgang eine Abstoßung von Elektronen aus den nicht mehr einfach gedachten Atomen zugrunde. Durch das Wandern der Elektronen wird die Elektrizität fortgeleitet. Jedenfalls lösen diese Strahlenarten nachweislich im Körper Elektronen aus, und diese rufen andererseits dieselben Wirkungen wie die andersgearteten Strahlungen hervor.

Wie in der Absorption äußert sich auch die Analogie zwischen den Elektronen- und atomistischen Strahlen in der Umsetzung der vernichteten Primärenergie. Die offene Frage, ob durch die Wirkung der Radiumstrahlen nicht etwa eine Zerspaltbarkeit der Atomkerne oder eine Umwandlung des Selens in eine allotrophische Form eintritt, bildet noch ein Problem von ungeahnter Tragweite.

Eine fundamentale Bedeutung für den Energiehaushalt der chlorophyllhaltigen Zelle besitzt die Tatsache, daß der Mechanismus der photochemischen Reaktionen bei Gegenwart des Selens, Radiums, bei der Aufspeicherung der Lichtenergie gewisse, noch nicht genug aufgeklärte Prozesse aufweist.

Auf Grund unserer Untersuchungen läßt sich annehmen, daß die Photosynthese in der chlorophyllhaltigen Zelle einen endothermischen Vorgang darstellt, bei welchem das gebildete Kaliumbicarbonat unter Einwirkung des Lichtes, der Radioaktivität und wahrscheinlich auch des Selens zu Ameisensäure, Sauerstoff und Kaliumcarbonat zersetzt und die gebildete Ameisensäure in Formaldehyd und Sauerstoff umgewandelt wird.

Bei diesem photosynthetischen Prozesse muß auch die Radioaktivität des Kaliums sowie die photochemische Wirkung des Selens zur vollen Geltung kommen[1].

[1] *Julius Stoklasa*, Beiträge zur Kenntnis der Ernährung der Zuckerrübe. Physiologische Bedeutung des Kaliumions im Organismus der Zuckerrübe. Verlag von Gustav Fischer, Jena 1916.

Berichtigung

zu der Arbeit *H. J. Hamburger:* Die Veränderlichkeit der Permeabilität mit besonderer Berücksichtigung der stereoisomeren Zucker. Ein Versuch zur Deutung dieser Veränderlichkeit, diese Zeitschr. **128,** 207. 1922.

Im modifizierten Membranschema von *Clowes* ist leider der Zusammenhang von Phasenreversion und $Ca^{..}$ irrtümlicherweise umgekehrt worden. Auf diesen Gegensatz zu dem richtigen Text hatte Herr Dr. *Raphael Liesegang* die Liebenswürdigkeit mich aufmerksam zu machen. Es soll heißen:

Ölkügelchen in Wasser $Ca^{..} = 0$
Öl in Wasserporen . . $Ca^{..} = 0{,}005\%$
Wasser in Ölporen . . $Ca^{..} = 0{,}0075\%$
Wasserkügelchen in Öl $Ca^{..} = 0{,}01\%$.

Und die Unterschrift soll lauten:

Umwandlung einer Emulsion von *Öl in Wasser* in eine Emulsion von *Wasser in Öl* durch Zusatz von ein wenig $Ca^{..}$-Ionen.

Autorenverzeichnis.

